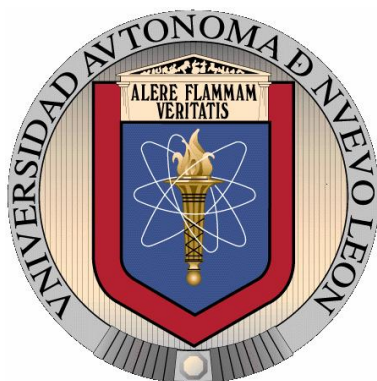


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**Desarrollo de un implante cultivado de CMM transducidas
con IGF-1 en una matriz de cartílago natural**

Tesis presentada por:

ING. BIOT. NIDIA KARINA MONCADA SAUCEDO

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Diciembre de 2014

Desarrollo de un implante cultivado de CMM transducidas con IGF-1 en una matriz de cartilago natural

Aprobación de Tesis:

Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Director de Tesis

Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Co-Director de Tesis

Dr. C. Jorge Lara Arias
Comisión de Tesis

Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); bajo la dirección de la Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. C. Augusto Rojas Martínez.

Las cirugías para la obtención de grasa en los borregos, se realizaron en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma universidad bajo la colaboración y asesoría del M.V.Z Adalberto Ábrego Guerra y el Dr. C. Jorge Lara Arias.

Los ensayos de histoquímica e inmunohistoquímica se realizaron en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Bioimagen y Biotecnología-CIDICS, ambos de la UANL, contando con la colaboración y asesoría del M.C. Víktor J. Romero Díaz.

La preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido se realizaron en el departamento de Embriología de la Facultad de Medicina bajo la asesoría de la Q.C.B. Guadalupe Valentina Esparza González; las fotografías se tomaron en el Centro de Investigación e Innovación en Ingeniería Aeronáutica (CIIA) con la colaboración de la M.C. María Lara Banda, ambos de la UANL.

Este trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina bajo el código BI12-002. Cuenta con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de la convocatoria S0008-2009-1.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme este regalo en mi vida con el que soñé desde pequeña, gracias por las personas que conocí y gracias porque no me faltó nada en el trayecto.

A mi **Familia** (Papá, Mamá, Erika y Beto) por apoyarme siempre en todos los aspectos, por corregir mis errores y celebrar mis logros que son suyos también. A Vany por ser mi apoyo en todo momento, por ser tan paciente en mis días de locura.

A mi asesora la **Dra. Herminia Martínez** porque aunque muchas veces la desesperé siempre me rectificaba su apoyo y asesoría, aun en mis momentos más estresantes.

A mi co-director el **Dr. Augusto Rojas** por confiarme este proyecto y ser paciente conmigo ante la adversidad, gracias por su asesoría y por tantas sonrisas que me dejó estar bajo su tutela.

Al **Dr. Jorge Lara** por ser tan sencillo, gracias por tu amistad y por siempre procurarme a lo largo del proyecto y a la **Dra. Lizeth Fuentes** por su asesoría y amistad, gracias por estar conmigo en todo momento y ayudarme hasta en los problemas más insignificantes.

Al **M.C. Víktor Romero** por su invaluable asesoría, por compartir sus conocimientos y por todos sus consejos académicos y personales.

A la **M.C. María Lara, Dra. Bárbara Bermúdez, Q.C.B. Guadalupe Esparza** y al **M. Res. Arcadio Valdés** por su paciencia y colaboración, gracias por ser tan amables al ayudarme en todo lo que necesité.

A mis compañeros de maestría **Chuy, Mauricio, Rolando, Gyssela, Selene, Brenda, Jazmín, Ulrich, Vanessa, Abraham, Muza y Memo** por los momentos tan divertidos y por todo su apoyo.

A la **M.C. Marcela Espinoza** y el **M.C. Manuel González** por toda su ayuda, por aguantar tanta pregunta que les hice y resolver mis dudas siempre sacándome una sonrisa, mil gracias por su amistad.

A los estudiantes **Luis López** y **Francisco Arellano** por toda su ayuda, por acompañarme hasta la madrugada creando implantes.

A todas las personas que laboran en la **Unidad de Genómica** y en la **Unidad de Terapias Experimentales del CIDICS** y en el laboratorio de **Terapia Celular** del departamento de **Bioquímica**, especialmente a Fátima, Alejandra, Paulina, Cecy, Iván, Alex, Gis, Marcela, Carlos Castro, Carlos Hernández, Yayis, Nancy y Mario.

A **Juani, Ari, Normita, Don Lalo, Cecy** y a todo el personal del departamento de bioquímica por siempre ser tan amables al momento de ayudar.

A **CONACYT** que sin su apoyo no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo.

A todas las personas que directa o indirectamente fueron cómplices y partícipes de este proyecto.

DEDICATORIA

A **mi familia** especialmente a mi padre por su ejemplo de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre con su ejemplo, gracias por todo tu apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, por tus sabios consejos y por todo tu amor, por unirnos más en la distancia. A mi madre, que sembró en mi la intriga de conocer la parte microscópica de la biología desde que era niña con aquel microscopio en navidad, gracias por todo tu amor y tu ejemplo de persona.

A **Vanessa**, por ayudarme sobre todo en estos últimos 6 meses del proyecto, porque sin tu esfuerzo no hubiera podido estar completamente dedicada este trabajo. Gracias por soportar mis malos ratos cuando algún experimento no me salía, pero sobre todo gracias por alentarme tanto.

A esa niña que soñaba con ponerse una bata, estar en un laboratorio e investigar.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	II
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	3
2.1 CARTÍLAGO ARTICULAR	3
2.1.1 CONDROCITOS	3
2.1.2 MATRIZ EXTRACELULAR	4
2.1.2.1 Agua	4
2.1.2.2 Colágeno	4
2.1.2.3 Proteoglucanos	6
2.1.2.4 Glicoproteínas extracelulares	6
2.1.3 ZONAS DE ORGANIZACIÓN EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR	7
2.1.4 METABOLISMO	7
2.1.5 CONDRÓGENESIS: FACTORES CONDRÓGENICOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	8
2.1.5.1 Factores de crecimiento y diferenciación	8
2.1.5.2 Factores de transcripción	10
2.1.6 LESIONES EN CARTÍLAGO ARTICULAR	10
2.1.6.1 Tratamiento	11
2.2 INGENIERÍA TISULAR EN LA REPARACIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR	12
2.2.1 FUENTE CELULAR	12
2.2.1.1 Condrocitos	12
2.2.1.2 Fibroblastos	13
2.2.1.3 Células Madre	14
2.2.2 MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN	15
2.2.3 ANDAMIOS	16
2.2.4 TERAPIA GÉNICA EN LA REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR	18
2.3 ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO	20
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	22
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	24
CAPÍTULO VI. ESTRATEGIA GENERAL	25
CAPÍTULO VII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 MATERIAL BIOLÓGICO	27
7.2 MATERIALES Y REACTIVOS	27
7.3 EQUIPOS	31

7.4 METODOLOGÍA	32
CAPÍTULO VIII. RESULTADOS	41
5.1 PRODUCCIÓN Y DESCELULARIZACIÓN DE LA MCB	41
5.2 AISLAMIENTO, CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CMMS.	41
5.3 CARACTERIZACIÓN DE CMMS POR INMUNOFENOTIPO	43
5.4 DESARROLLO DE IMPLANTES, SU VIABILIDAD CELULAR Y MICROESTRUCTURA	43
5.5 PRESENCIA DE LA PROTEÍNA IGF-1 EN EL MEDIO DE CULTIVO	44
5.6 CULTIVO DE IMPLANTES	44
5.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES CONDRÓGENICOS	46
5.8 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	52
CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN	56
9.1 DESCELULARIZACIÓN DE LA MCB	56
9.2 INMUNOFENOTIPO DE LAS CMMS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO	57
9.3 DESARROLLO DE IMPLANTES	58
9.4 MICROESTRUCTURA DE IMPLANTES	59
9.5 EXPRESIÓN DE MARCADORES CONDRÓGENICOS	60
9.6 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL IMPLANTE	61
CAPÍTULO X. CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO XI. PERSPECTIVAS	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	73
ANEXO 2. PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS	75

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Descripción de los anticuerpos empleados para citometría de flujo.
- Tabla 2.** Descripción de primers empleados en el estudio.
- Tabla 3.** Descripción de anticuerpos utilizados en las inmunohistoquímicas.
- Tabla 4.** Descripción de anticuerpos utilizados en el Western blot.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo propuesto de la organización de las proteínas y glicoproteínas dentro de la MEC del cartílago articular.
- Figura 2.** Organización de la MEC en función de la proximidad a los condrocitos.
- Figura 3.** Zonas del cartílago articular
- Figura 4.** Secuencia de eventos en la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos.
- Figura 5.** Potencial multilinaje de las células madre mesenquimales.
- Figura 6.** Diagrama de la estrategia general del proyecto.
- Figura 7.** Producción de matriz de cartílago bovino.
- Figura 8.** Extracción de tejido adiposo en borregos.
- Figura 9.** Almacenamiento de muestras para MEB.
- Figura 10.** Esquema general de la creación de los implantes.
- Figura 11.** Escala de evaluación Bern/O'Driscoll empleada en el análisis histológico.
- Figura 12.** Descelularización de la MCB.
- Figura 13.** Dimensión de las partículas de MCB.
- Figura 14.** Cultivo de CMMs.
- Figura 15.** Histogramas del inmunofenotipo de CMMs.
- Figura 16.** Implantes.
- Figura 17.** Corte histológico del implante.
- Figura 18.** Viabilidad celular en el implante.
- Figura 19.** Secreción de la proteína IGF-1 al medio de cultivo.
- Figura 20.** Microestructura por microscopía electrónica de barrido.
- Figura 21.** Desarrollo del cultivo en monocapa con medio condrogénico.
- Figura 22.** Cultivo de implantes y CE.
- Figura 23.** Tamaño de implantes.

- Figura 24.** Curvas de disociación y gráfico de expresión en ensayo de expresión génica.
- Figura 25.** Expresión génica de marcadores condrogénicos.
- Figura 26.** Análisis de marcadores por Western blot y densitometría.
- Figura 27.** Inmunohistoquímica.
- Figura 28.** Tinciones histológicas.
- Figura 29.** Mapa de calor por agrupamiento de similitud no supervisado.
- Figura 30.** Análisis histológico.

ABREVIATURAS

AGC	Agrecano
BGC	Biglicano
CE	Condroesfera
CMMs	Células madre mesenquimales
COL I	Colágeno tipo I
COL II	Colágeno tipo II
COMP	Proteína oligomérica de matriz de cartilago
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMEM Adv	Dulbecco's modified Eagle medium Advanced
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
g	gramos
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	horas
I2C	Implante de dos componentes
I3C	Implante de tres componentes
ICA	Implante de condrocitos autólogos
ICRS	International Cartilage Research Society
IGF-1	Factor de crecimiento similar a insulina-1
ISCT	International Society for Cell Therapy
MCB	Matriz de cartílago bovino
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEC	Matriz extracelular
min	minutos
ml	mililitros
MOI	Multiplicidad de infección
nm	nanómetros
PBS	Phosphate buffered saline (Buffer de fosfatos)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	picogramos
PGC	Proteoglicano
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
qRT-PCR	Transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SFB	Suero fetal bovino
um	Micrómetros

RESUMEN

Ing. Biot. Nidia Karina Moncada Saucedo

Fecha de Graduación: Diciembre de 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Título del Estudio: Desarrollo de un implante cultivado de CMM transducidas Con IGF-1 en una matriz de cartílago natural

Área de Estudio: Ingeniería Genética

Número de paginas: 79

INTRODUCCIÓN: Las lesiones del cartílago articular son causales frecuentes de incapacidad en el mundo, lo que genera un problema de alto costo para el sector salud. Entre los problemas a resolver en la construcción de un implante biotecnológico para regeneración articular, está la creación de un sistema de andamiaje que permita la regeneración de este tejido y que posea propiedades biomecánicas similares al cartílago nativo. En este trabajo se creó un implante basado en 3 componentes: Células madre mesenquimales (CMMs), vector Ad-IGF1 más matriz de cartílago bovino/alginate para su aplicación en regeneración de cartílago articular. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto de la expresión *in vitro* de IGF-1 sobre la condrogénesis en un implante cultivado con CMMs ovinas y MCB en cultivo prolongado. **MÉTODOS:** Se generaron 3 grupos experimentales (CE: condroesfera, I2C: implante de dos componentes e I3C: implante de tres componentes). Se aislaron CMMs derivadas de tejido adiposo de ovinos y se prediferenciaron por inductores químicos: para el grupo CE por 28 días, grupo I2C por 7 días, grupo I3C por 7 días además de 100 MOI de Ad-IGF1. Posteriormente las células de I2C e I3C se colocaron en un andamio bifásico de MCB/alginate cultivadas por 21 días con medio condrogénico. Se evaluó la presencia de marcadores de diferenciación condrogénica a nivel transcripcional (qRT-PCR, día 28), y traduccional (Western blot, día 14 y 28). Se detectó la presencia de la proteína IGF-1 secretada al medio por ensayo de ELISA al día 0, 7 y 14 en el implante y se realizaron análisis histoquímicos (trícromico de Masson, safranina O/verde rápido y H&E) e inmunohistoquímicos (Colágeno I y II) al día 28, evaluándose histológicamente por la escala de Bern/O'Driscoll. La microestructura de los grupos generados se evaluó por microscopía electrónica de barrido. **RESULTADOS:** Las CMMs aisladas muestran marcadores de superficie característicos (CD105+, CD29+, CD45- CD14- y CD34-). No se encontraron diferencias significativas en la producción de colágeno II a nivel de proteína entre los grupos I2C e I3C, de igual forma no hubo diferencias significativas en la expresión génica de colágeno I, agregano, biglicano, proteoglucano y proteína oligomérica de matriz de cartílago en estos grupos, sin embargo, el I3C conservó la morfología celular ovoide característica de células similares a condrocitos y es capaz de producir una matriz más densa con cantidades altas de proteoglucanos sulfatados a comparación del I2C, además de niveles moderados de colágeno II. **CONCLUSIÓN:** Se generó un sistema de andamiaje de tres componentes (MCB/alginate, CMMs más Ad-IGF1), el cual provee un entorno temporal que ayuda a la infiltración, adhesión, proliferación y diferenciación de las células con una distribución homogénea, produciendo una MEC densa con proteoglucanos propios del cartílago hialino y colágeno II para su aplicación en la regeneración del cartílago articular.

Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Director de tesis

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de Salud (OMS) ha identificado a las enfermedades musculoesqueléticas como las causales más frecuentes de incapacidad en el mundo, lo que afecta gravemente la capacidad de las personas para desarrollar sus actividades habituales. Las lesiones de las articulaciones se deben principalmente al desgaste natural, traumatismos o enfermedades autoinmunes, lo que provoca un problema médico de alto costo para el sector salud.^{1,2}

El cartílago articular es un tipo de tejido conectivo que rodea a las articulaciones diartrodiales. Se han desarrollado diversos esfuerzos en la búsqueda de la regeneración articular, desde perforaciones hasta el hueso subcondral para potenciar la regeneración, injertos osteocondrales y siembra de condrocitos sobre una matriz ósea. En 1979 se realizó el reemplazo completo de articulación y la estimulación de médula ósea de hueso subcondral, años mas tarde en 1984, se realizó la primera implantación de condrocitos cultivados *in vitro*.³ Debido a la limitada capacidad de auto-reparación, el cartílago articular es un candidato ideal para la ingeniería tisular.

La ingeniería tisular es una rama de la bioingeniería cuyo enfoque básico implica el uso de células, andamios y factores de señalización solos o en combinación para reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido lesionado.^{4,5}

A pesar de las investigaciones en el campo, no se ha logrado restablecer la arquitectura natural del tejido, por lo que resulta importante comprender los mecanismos moleculares y fisiológicos que ayuden a una correcta regeneración articular para brindar una terapia efectiva que permita recuperar de manera óptima las funciones del tejido.

En esta sección se describe la estructura, composición y función del cartílago articular, presentando a la ingeniería tisular como un método para potenciar la reparación de este tejido.

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

2.1 CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago es un tipo de tejido conectivo cuya función es proteger los huesos de las articulaciones diartrodiales de las fuerzas de fricción asociadas con el soporte de carga e impacto.^{6,7} El cartílago hialino o articular es heterólogo, con una densidad y organización que varía según la profundidad de sus zonas⁸, es predominantemente avascular, aneural y alinfático⁹, por lo que su principal forma de nutrirse es a través del líquido sinovial, ayudado por fuerzas mecánicas de compresión.

El cartílago articular forma una capa delgada de tejido, que varía en espesor dependiendo de la localización en el cuerpo. En los seres humanos varía de 1 a 4 mm, dependiendo de la articulación.⁷ Este tejido tiene capacidad visco-elástica, dándole la característica de deformarse para aumentar el área de superficie total de contacto con el fin de reducir el estrés, y aumentar la resistencia a los daños causados por las cargas aplicadas. Esta función depende de la organización de sus macromoléculas en la matriz extracelular, particularmente de la disposición y orientación de las fibras de colágeno.¹⁰

Una característica importante del cartílago que ayuda al soporte de cargas es su coeficiente de fricción (0.002-0.02), el cual depende de muchos factores que lo disminuyen, como la calidad del líquido sinovial, la deformación elástica del cartílago y efusión del líquido desde el mismo también existen factores que aumentan el coeficiente de fricción, como alteración en la superficie del cartílago (fibrilación).¹¹

2.1.1 Condrocitos

El cartílago está formado por un solo tipo de células especializadas llamadas condrocitos, representan aproximadamente del 5 al 10% del tejido^{11,12} los cuales se encuentran embebidos y agrupados en una matriz extracelular (MEC) que estos mismos secretan, representando el 95% del volumen, son capaces de despolimerizarla y eliminarla para ensanchar sus lagunas, este rasgo es característico en el proceso de osificación endocondral.¹¹ También están presentes de manera aislada o agrupados en grupos isógenos, dependiendo de su actividad metabólica; es decir, las células que acaban de dividirse son condrocitos activos que poseen un aparato de Golgi muy

grande y un citoplasma basófilo, eso significa que puede ser teñido con colorantes básicos con carga neta positiva como la hematoxilina. Estas características indican que se está realizando una síntesis proteica y se ubican inicialmente en la misma laguna, pero a medida que secretan nueva matriz intercelular se van separando; a diferencia de los condrocitos iniciales, los de baja o nula actividad poseen un citoplasma claro y un aparato de Golgi pequeño.^{7,11}

La función celular además de ser determinada por cambios sufridos en la propia MEC, también es influida por variaciones de la presión en la membrana celular, la edad y determinados factores de crecimiento.¹¹

2.1.2 Matriz extracelular

Más del 98% del cartílago articular corresponde a la MEC. La matriz extracelular se compone de agua, gases, metabolitos, cationes y un conjunto de macromoléculas que incluyen al colágeno tipo II y proteoglucanos. La MEC es responsable de las propiedades mecánicas del cartílago.¹¹ La figura 1 muestra un modelo propuesto de la organización de las proteínas y glicoproteínas dentro de la matriz extracelular del cartílago articular.

2.1.2.1 Agua

El agua conforma entre el 60 y 80% de la MEC, su función es permitir la deformación del cartílago en respuesta al estrés, además de ser importante para la nutrición del cartílago y la lubricación articular. Cuando la cantidad de agua aumenta hasta un 90%, como en el caso de la osteoartritis (OA), ocasiona una mayor permeabilidad, a su vez, causa un descenso de la resistencia y se compromete su propiedad elástica.¹¹

2.1.2.2 Colágeno

El colágeno constituye entre el 10 y 20% de la matriz, encontrándose en mayor cantidad el tipo II (90-95%), confiriendo al cartílago una gran resistencia a la tensión. Existen también colágenos tipo I, V, VI, IX, X y XI en pequeñas cantidades. En procesos de OA se puede encontrar colágeno tipo VI, el colágeno X solo está presente en fases de osificación osteocondral, asociándose por lo tanto a la calcificación del cartílago.¹¹ El colágeno tipo II forma fibrillas que proporcionan resistencia a la tracción a lo largo de la MEC. El colágeno VI se piensa que forma redes hexagonales en las proximidades de las células donde se puede vincular a las fibrillas de colágeno II a través matrillin-4 y biglicano (figura 1).

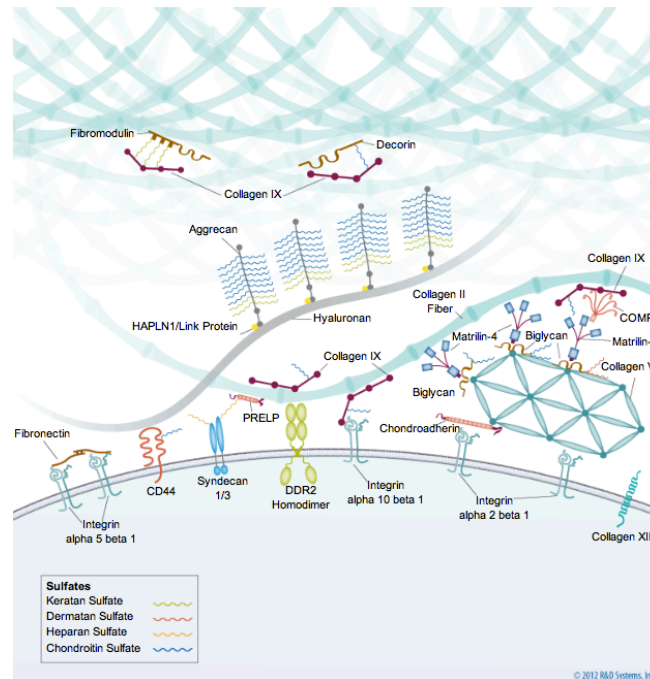


Figura 1. Modelo propuesto de la organización de las proteínas y glicoproteínas dentro de la MEC del cartílago articular. La proteína de membrana CD44 del condrocito, interactúa de manera perpendicular con el ácido hialurónico y éste de manera cruzada con las fibras de colágeno tipo II.

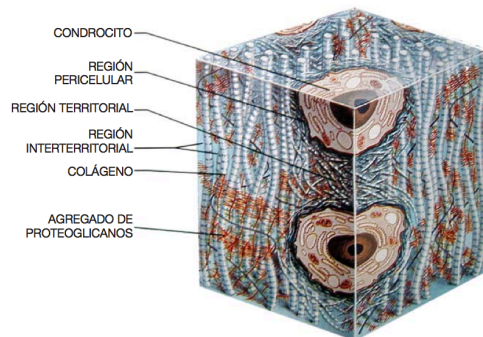


Figura 2. Organización de la MEC en función de la proximidad a los condrocitos. Se observa la estrecha relación de los condrocitos con su microambiente. Los condrocitos se encargan de generar y mantener la MEC dependiendo de los estímulos recibidos.¹¹

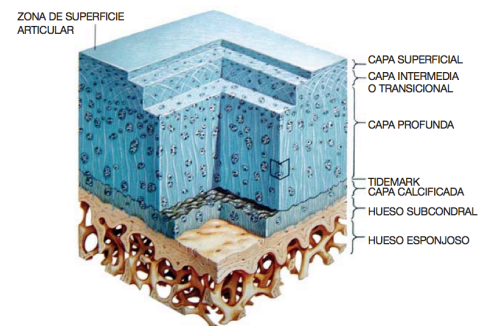


Figura 3. Zonas del cartílago articular. Se aprecia la zona o capa superficial donde se encuentran los condrocitos aplanados, por debajo de ella, la zona intermedia donde los condrocitos se aprecian alargados; la zona profunda o radial, donde los condrocitos se disponen en columnas y por último la zona calcificada carente de condrocitos.

2.1.2.3 Proteoglucanos

Los proteoglucanos (PGs) representan del 10 al 15% de la MEC y son las principales proteínas no colágenas presentes en el cartílago. Estas macromoléculas son responsables de la compresión del cartílago y son secretadas por los condrocitos. Los PGs están compuestos de subunidades denominadas glicosaminoglicanos (GAGs), estos se unen a un núcleo proteico, formando agreganos o proteoglucanos, los cuales son unidos mediante proteínas de enlace al ácido hialurónico para formar agregados de proteoglucanos. Entre los más frecuentes están el condroitín-4-sulfato, que disminuye con los años; el condroitín-6-sulfato, que se mantiene constante con los años; el queratán sulfato, que tiende a aumentar con la edad y el dermatán sulfato. El ácido hialurónico es un GAG no sulfatado y carente de proteína central, por lo tanto no forma PGs. La vida media de los PGs es de tres meses, al tener la capacidad de retener agua son los responsables de la estructura porosa del cartílago.¹¹

El agregano es el PG más frecuente en el cartílago articular y consta de una proteína central con varios dominios, lo cual brinda características específicas a la molécula. Cadenas de sulfato de condroitina y sulfato de queratán se unen a la proteína central del agregano dando una estructura similar a un cepillo (figura 1). La región N-terminal de la proteína central del agregano contiene dos dominios globulares (G1 y G2), siendo el domino G1 el que interacciona con el ácido hialurónico.¹³ Entre los PGs menos abundantes se encuentran el biglicano, la decorina y la fibromodulina.¹¹

2.1.2.4 Glicoproteínas extracelulares

Entre éstas se encuentran la ancorina CII, fibronectina, laminina e integrina. Su función es unir a los condrocitos con la MEC, siendo la integrina la más importante debido a que interacciona con receptores celulares y participa en la regulación de la migración, proliferación y diferenciación de los condrocitos.¹¹ Normalmente el cartílago presenta inhibidores de proteasas que ayudan en la renovación continua de los componentes de la MEC. La composición de la MEC varía en función de la capa de cartílago y de la proximidad respecto a los condrocitos (figura 2); de esta manera, los PGs ricos en queratán-sulfato se acumulan en la MEC interna que se encuentra entre los condrocitos; en la MEC territorial se encuentra de manera más abundante los PGs ricos en condroitín-sulfato.¹¹

Las integrinas de unión y adhesión focal contribuyen a la activación de vías de señalización dentro de la célula, que culminan en cambios en la supervivencia celular,

la proliferación y la expresión de genes.¹⁴ Estudios *in vitro* demuestran que los condrocitos pueden interactuar con diversas proteínas de la MEC a través de diferentes integrinas, tales como la fibronectina, laminina, vitronectina, osteopontina, sialoproteína ósea II, y los tipos de colágeno I, II y VI.^{15,16}

2.1.3 Zonas de organización en el cartílago articular

El cartílago articular está organizado además en cuatro zonas (figura 3):

a. Zona superficial o de deslizamiento (40 µm): Es la zona resistente a la compresión y está en contacto con el líquido articular.¹⁷ Su actividad metabólica es escasa, tiene pocos proteoglucanos y una elevada concentración de fibras de colágeno tipo II.^{7,11,17,18}

b. Zona intermedia o de transición (500 µm): Se encuentra inmediatamente por debajo de la zona superficial y tiene una elevada actividad metabólica. La cantidad de proteoglucanos es mayor, pero decrece la cantidad de colágeno y los condrocitos son mas redondeados.^{7,11,17,18}

c. Zona profunda o radial (1000 µm): Zona rica en proteoglucanos, los condrocitos poseen morfología esférica.^{7,11,17,18}

d. Zona calcificada (300 µm): No presenta proteoglucanos. Los condrocitos son pequeños y escasos.^{11,17} Presenta cristales de hidroxipatita y está adyacente al hueso subcondral. Funge como capa de anclaje del cartílago al hueso, encontrándose separada de la zona anterior por la barrera “tidemark” (línea de flujo) donde penetran las fibras de colágeno para brindar soporte.^{7,11,17,18}

2.1.4 Metabolismo

El metabolismo de los condrocitos está modulado por la estimulación mecánica, como es un tejido avascular obtiene los nutrientes principalmente del líquido sinovial. La capa más profunda puede nutrirse a partir de la vascularización epifisiaria. El cartílago articular es responsable de la síntesis y el catabolismo del colágeno, además de que sintetiza y degrada los proteoglucanos.

Entre los factores de crecimiento que regulan la síntesis de cartílago articular se encuentra el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que puede estar involucrado en la curación de laceraciones en el cartílago; el factor de crecimiento

transformante beta (TGF- β), encargado de estimular la síntesis de PGs y la formación de inhibidores de plasmina y estromeliasina; el factor de crecimiento fibroblástico (b-FGF), involucrado en la estimulación de la síntesis de ADN en condrocitos adultos; y el factor de crecimiento análogo a la Insulina (IGF-I), el cual estimula la síntesis de ADN y MEC en el cartílago adulto y en placas de cultivo.¹¹

El metabolismo del cartílago se ve modificado conforme a la edad, de manera general: los condrocitos se agrandan, se vuelve hipocelular, disminuyen los PGs en cantidad, proporción y tamaño, aumenta el contenido en proteínas y disminuye el agua. Por todo lo anterior hay una disminución en la elasticidad y aumento en la rigidez del cartílago articular.

2.1.5 Condrogénesis: factores condrogénicos y vías de señalización

La formación de cartílago comienza en la mesénquima por la condensación y diferenciación de CMMs a pre-condrocitos, en esta primera fase las células expresan colágeno tipo I y IIA,¹⁹ además sintetizan GAGs y moléculas de adhesión tales como cadherina y la molécula de adhesión celular neural (NCAM).²⁰ Esto es debido a la presencia en el microambiente celular de factores, tales como algunos miembros de la superfamilia TGF- β . TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 inducen la síntesis de moléculas de adhesión como sindecano, tenascina y fibronectina.²¹ Al mismo tiempo, la mayoría de los vasos sanguíneos desaparecen, permaneciendo solo los estimulados por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La diferenciación condrogénica continúa y los pre-condrocitos comienzan a expresar factores específicos de transcripción como SOX9, L-SOX5 y SOX6. En esta etapa de diferenciación, los pre-condrocitos se transforman en condrocitos maduros y producen una MEC rica en PGs y fibras de colágeno (colágeno tipo II, IX y XI).^{22,19} En particular la síntesis de colágeno IIB es el principal indicador de la maduración de los condrocitos.¹⁹

Durante el desarrollo del cartílago, varios factores de crecimiento, factores de diferenciación y factores de transcripción están implicados en las diferentes etapas y niveles específicos (figura 4).

2.1.5.1 Factores de crecimiento y diferenciación

IGF: Los factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) son proteínas que pueden regular el crecimiento, la diferenciación, migración y supervivencia celular, existen dos isoformas: IGF-1 e IGF-2. IGF-1 tiene un papel importante en la proliferación celular, se

produce principalmente en el hígado, pero también es producido por los condrocitos,²³ teniendo así una regulación autocrina y/o paracrina²⁴. Está presente en etapas tempranas de la diferenciación condrogénica (figura 5), induce la proliferación de condrocitos y estimula la diferenciación de las CMMs a pre-condrocitos.

IGFs actúan a través del receptor tirosina quinasa tipo I (IGFIR) que desencadena la actividad mitogénica, regulada por señales extracelulares quinasa-quinasa (MEK, ERK, y MAPK) y la vía fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt). Varias investigaciones en modelos animales *in vivo* han demostrado que IGF promueve significativamente el crecimiento y la síntesis de matriz en el cartílago articular y también mejora la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II.²⁵

TGF- β : La superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) es probablemente el grupo de hormonas más estudiado en el cartílago y la regeneración ósea, comprende más de 30 miembros²⁶, entre los más prometedores en el área de la ingeniería de tejidos para el cartílago están el TGF- β y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), destacando BMP-2, GDF-5 y BMP-7,^{27,23} estos se expresan ampliamente en los condrocitos y constituyen la clase de factores de crecimiento implicados casi exclusivamente en el proceso condrogénico. TGF- β s generalmente inducen la diferenciación de las CMMs en condrocitos, estimula su proliferación al aumentar la producción de la MEC e inhibe la osificación endocondral.²²

Los tres isotipos de TGF- β (β 1, β 2, y β 3) son secretados en su forma inactiva y se activan sólo cuando se disocia de un péptido asociado a la latencia (LAP). TGF- β inicia la señalización por unión al receptor serina/treonina quinasa tipo I y II en la superficie celular, que luego se propaga la señal a través de la fosforilación de la proteína Smad R (Smad 2 y 3). La señalización de TGF- β también está regulada negativamente por la I-Smad (Smad 6 y 7), que interfiere con la fosforilación de R-Smad. TGF- β también activa las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).²⁵

FGF: Los factores de crecimiento de fibroblastos pertenecen a una familia de polipéptidos que están implicados en varias funciones incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la motilidad, esenciales durante el crecimiento, el desarrollo y la reparación de cartílago. Los FGF desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de células madre y su activación.^{28,27}

La unión de FGF a FGFR (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos) conduce a la activación de vías de señalización, incluyendo PI3K, Src, la fosfolipasa C γ , MAPKs, ERK y p38. En particular, dos miembros de la familia FGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, también conocida como FGF-2) y factor de crecimiento de fibroblastos-18 (FGF-18), juegan un importante papel regulador en el mantenimiento de la homeostasis de la matriz del cartílago.²⁵

VEGF: El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es una hormona que parece ser importante en la placa de crecimiento del cartílago, donde apoya la formación de hueso endocondral, aparentemente mediante la atracción de células endoteliales de la médula ósea. Se ha llegado a especular que este factor podría apoyar el ciclo mitótico de condrocitos, aunque se sabe poco acerca de esta característica²⁹.

PDGF: El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un factor mitogénico y quimiotáctico potente para todas las células de origen mesenquimal, incluyendo condrocitos y células madre mesenquimales. Está relacionado con el aumento de la proliferación celular y la producción de proteoglucanos^{30,19}.

2.1.5.2 Factores de transcripción

Muchos factores de transcripción están involucrados durante la condrogénesis y osificación endocondral dependiendo de la ubicación de los condrocitos dentro del cartílago articular. Existen tres principales factores de transcripción implicados en la condrogénesis: Sox9, L-Sox5 y Sox6 (figura 4).

Sox9 está implicado en la fase de condensación de CMMs en pre-condrocitos. Las células comienzan a expresar de forma agregada Sox9 y comienzan a diferenciarse. Sox9 juega un papel muy importante en la fase siguiente de condensación de CMMs, ya que estimula la expresión de marcadores específicos de cartílago e inhibe la diferenciación terminal de condrocitos. Sox9 también induce la expresión de los factores de transcripción L-SOX5 y SOX6, que definitivamente comprometen a las CMMs a desarrollarse en el linaje condrogénico.³¹

2.1.6 Lesiones en cartílago articular

La degradación del cartílago articular puede surgir de un trauma, enfermedad o carga mecánica continua. Podemos mencionar tres tipos principales de lesión del cartílago: la interrupción de la matriz superficial en la cual se daña la MEC pero se cuenta con

condrocitos viables capaces de sintetizar una nueva MEC,^{7,32} aunque no se tiene acceso a las células de la médula³³; los defectos de espesor parcial en donde se encuentra interrumpida la superficie del cartílago pero no se extiende al hueso subcondral, por lo que no existe la auto-reparación^{7,32} y los defectos de espesor total, estos representan daños que penetran profundamente en el hueso subcondral y normalmente se reparan con fibrocartílago, el cual es mas débil que el cartílago.^{7,32,33}

La OA es la enfermedad articular más común en el mundo y es una de las causas más importantes de dolor y discapacidad en los adultos, lo que lleva a consecuencias socioeconómicas significativas. Su prevalencia se ve agravada por el envejecimiento de la población y el aumento en la obesidad. Así, más del 80% de las personas mayores de 75 años tienden a desarrollar OA. Esta enfermedad es generalmente más alta en las mujeres que en hombres, con el 13% en mujeres mayores de 60 años contra el 10% de los hombres.¹⁹

2.1.6.1 Tratamiento

El tratamiento de las lesiones del cartílago depende de la clasificación de la lesión a tratar, edad del paciente y actividad del mismo, buscando en todas ellas reducir el dolor y recuperar la funcionalidad. Se debe realizar una evaluación a largo plazo para definir si el tratamiento es exitoso, valorando el rendimiento, similitud con el tejido normal en base a su composición y propiedades mecánicas. La regeneración no tiene lugar si no se tiene acceso a células progenitoras o condrocitos para síntesis de tejido de novo. Las técnicas actuales de tratamiento clínico incluyen técnicas artroscópicas, que incluyen el afeitado, desbridamiento, condroplastía de abrasión, perforación Pride y microfractura; técnicas que incluyen los principios de trasplante de tejidos como la mosaicoplastía (trasplante osteocondral), y la ingeniería tisular que incluye el implante de condrocitos autólogos (ICA).^{6,7,32}

El ICA es el método más común para regenerar los defectos del cartílago en ingeniería tisular, para los defectos de espesor completo hasta el hueso subcondral y requiere de una muestra pequeña de cartílago (200-300 mg) tomada a partir de regiones que no soportan peso en la articulación,³⁴ esto presenta la limitante de disponibilidad del material.

2.2 INGENIERÍA TISULAR EN LA REPARACIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR

El término ingeniería tisular se propuso en 1987 durante la reunión de la Fundación Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América, se define como la rama de la bioingeniería cuyo fundamento es el uso de un sustrato celular vivo, sumado a la manipulación y diseño del entorno extracelular, para la creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo para reparar, remplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido lesionado por enfermedad o trauma.^{4,5}

Los enfoques de la ingeniería tisular implican andamios libres de células, o por otra parte células o tejidos generados *in vitro*. En el primer caso, el andamio se utiliza para definir el espacio para el nuevo crecimiento del tejido y para mejorar la maduración y función del tejido que se pretende crecer en el andamio. El segundo enfoque se basa en sembrar células en un andamio o soporte que serán entregados y retenidos en el lugar de la lesión.

Existen 4 campos importantes a considerar en la ingeniería tisular: fuente celular, andamios/matrices, moléculas estimulantes y propiedades biomecánicas.

2.2.1 Fuente celular

Muchas han sido las investigaciones para identificar la fuente óptima de células para la ingeniería de tejido de cartílago, entre las células más utilizadas se encuentran los condrocitos, fibroblastos, células madre, y células modificadas genéticamente. La finalidad es encontrar una fuente ideal de células que puedan ser fácilmente aisladas, sean capaces de expandirse y se puedan cultivar para expresar y sintetizar componentes propios de la MEC.

2.2.1.1 Condrocitos

Muchos estudios se han centrado en el uso de condrocitos articulares como una fuente de células viables para la reparación del cartílago. Debido a que los condrocitos están de manera escasa en el cartílago, por lo general se necesitan expandirlos antes de usarlos, esto genera problemas de des-diferenciación³⁵, lo que se ve reflejado en la disminución de la síntesis de proteoglucanos y colágeno de tipo II, así como en el aumento de la expresión de colágeno tipo I.¹² Sin embargo, la recolección del cartílago

articular es un procedimiento altamente invasivo, acompañado por el potencial de morbilidad del sitio donante y la pérdida de la función, lo que impulsa a buscar otras fuentes celulares.

Brodkinb y col.¹⁴ realizaron estudios donde se observó el fenotipo de los condrocitos en diferentes matrices extracelulares cultivados en monocapa, concluyendo que los sustratos recubiertos con fibronectina y colágeno tipo I/II en combinación, no fueron capaces de prevenir la pérdida del fenotipo, aunque los condrocitos cultivados en colágeno tipo II fueron capaces de recuperar su fenotipo cuando se cultivan en medio condrogénico y expresaron mayor ARNm para colágeno tipo II y una mayor producción de GAGs en el cultivo de tejidos de poliestireno.

Cuando los condrocitos están diferenciados se caracterizan por una morfología redondeada y la producción de moléculas de la MEC, como colágeno tipo II y glicosaminoglicanos sulfatados. Para poder usar los condrocitos como fuente de células deben de tener en equilibrio sus procesos catabólicos y anabólicos, como las metaloproteinasas de matriz y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.¹²

La primera generación de ICA se realizó en 1987, por primera vez se usaron células en el entorno clínico para el tratamiento de lesiones condrales u osteocondrales de rodilla, después de la expansión en cultivo *in vitro*.³⁶⁻³⁸ En la segunda generación de ICA se buscaba aminorar los inconvenientes de la técnica anterior, pero aun se tenían implantes de condrocitos des-diferenciados, ya que perdían su morfología después de la expansión *in vitro* o en la implantación *in vivo*. En la tercera generación se ha tratado de mejorar este procedimiento embebiendo los condrocitos en una matriz tridimensional antes del trasplante de cartílago en los lugares de la lesión⁶, algunas de éstas se desarrollan mecánicamente para preservar un fenotipo condrogénico estable, se usan también condrocitos que posean un perfil específico predictivo de la formación de cartílago hialino estable. Se usan condrocitos jóvenes alógenos o condrocitos autólogos inmediatamente después de ser recolectados, sin expandirlos en cultivos.^{7,37}

2.2.1.2 Fibroblastos

A pesar de que los fibroblastos cultivados en mallas de poli(ácido láctico) conduce a la producción de tejido fibroso, los fibroblastos pueden ser redirigidos hacia un fenotipo condrocítico cuando se cultivan bajo las condiciones apropiadas.³⁹

French y col.⁴⁰, pre-trataron fibroblastos dérmicos humanos con IGF-I y los cultivaron en agregado, observaron formación de agregados densos que tiñen positivo para GAG y colágeno tipo II, lo que sugiere ser una fuente de células que puede resultar igualmente exitoso para la generación de cartílago.

Se ha observado que los fibroblastos dérmicos cultivados en la presencia de hueso desmineralizado,⁴¹ o cultivados como cultivos de micromasa de alta densidad en la presencia de ácido láctico⁴² expresa proteínas de la matriz del cartílago específicos como agregado y colágeno de tipo II. Sin embargo los fibroblastos no han mostrado ser una fuente satisfactoria de células para la condrogénesis.

2.2.1.3 Células Madre

Las células madre son células no especializadas capaces de renovarse a través de la división celular, tienen el potencial extraordinario para convertirse en múltiples linajes celulares diferentes, además, tienen la característica de dividirse asimétricamente, es decir, cada célula madre produce al dividirse dos células hijas: una de ellas conserva las características de célula madre y la otra podrá diferenciarse hacia un linaje celular.⁴³

Las células madre mesenquimales se han considerado como una alternativa prometedora para la regeneración de las lesiones del cartílago. Las CMMs son células madre pluripotentes con la capacidad de diferenciarse en una variedad de células del tejido conectivo, hueso, cartílago, músculo, estroma de la médula, tendón/ligamento, grasa, y otros tejidos conectivos (figura 5).^{7,32,44}

Las CMM se caracterizan por secretar factores tróficos como las citoquinas y factores de crecimiento que intervienen en la actividad celular para su diferenciación. Se ha demostrado que las CMMs secretan factores que suprimen la respuesta inmunológica a través de la inhibición de TNF- α e IFN- γ .⁷

La Sociedad Internacional para la Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy-ISCT) ha propuesto que las poblaciones de CMMs deben ser positivas para antígenos de superficie, tales como, CD73, CD90 y CD105; además, estas células deben carecer de la expresión de antígenos hematopoyéticos como CD45, CD34 y marcadores para los monocitos, los macrófagos y las células B.⁴⁵

Las CMM derivadas de tejido adiposo han ganado aceptación en la regeneración de

cartílago, debido a que sus métodos de obtención son poco invasivos y son multipotentes, lo que hace posible diferenciarse hacia el linaje condrogénico. Además, estas células se han utilizado *in vivo* y tienen el potencial de sintetizar moléculas de la matriz del cartílago.⁴⁶ Se ha encontrado que las células de tejido adiposo expresan receptores de superficie similares a las células estromales de médula ósea, entre las cuales se encuentran CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD49(d), CD49(e), CD54, CD55, CD59, CD106, CD146, CD150 y CD166.⁴⁷

Las CMMs representan una fracción menor de la población de células nucleadas totales, tanto en las derivadas de médula ósea como en las de tejido adiposo, con una frecuencia aproximada de 1 y 100 CMMs por 5×10^3 células mononucleares, respectivamente.⁴⁸

Entre otras fuentes de células madre se encuentran las derivadas de médula ósea, cordón umbilical, líquido sinovial y embrionarias, sin embargo, muchos factores han limitado su aplicación a la terapia celular en humanos, incluidas cuestiones éticas, el potencial de crecimiento de los tumores malignos, la diferenciación heterogénea y métodos invasivos para su obtención.^{49,50}

2.2.2 Moléculas de señalización

Citocinas, hormonas y factores de crecimiento se sabe que influyen en los procesos anabólicos y catabólicos por los condrocitos. Por lo tanto, un número de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento transformante (TGF- α), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), y en menor medida los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), se han utilizado en los estudios de ingeniería de tejidos de cartílago *in vitro* para promover el fenotipo condrogénico, estimular la producción de MEC y para promover la condrogénesis de CMM.⁵¹

Una variedad de sustratos y factores de crecimiento, como factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) se han utilizado para prevenir o retrasar la desdiferenciación de condrocitos en cultivos en monocapa.¹² De Mattei y col., observaron en su estudio que campos electromagnéticos pueden actuar en conjunto con IGF-I para la estimulación de PG en explantes de cartílago articular⁵².

El papel de IGF-I en el metabolismo del cartílago articular ha sido ampliamente estudiado, se ha observado que cuando se añade de manera exógena a los cultivos en monocapa o de explantes de cartílago articular en diversas especies, IGF-I induce una serie de efectos anabólicos y disminuye los procesos catabólicos,^{27,13,53} principalmente funciona como una molécula inductora endocrina, parácrina y autócrina.⁵⁴ En la figura 4 se puede observar que la importancia de IGF-I es en etapas tempranas de la diferenciación condrogénica de CMMs, se tienen reportes de que posee un efecto aditivo cuando se utiliza en combinación con TGF- β 1.⁵⁵

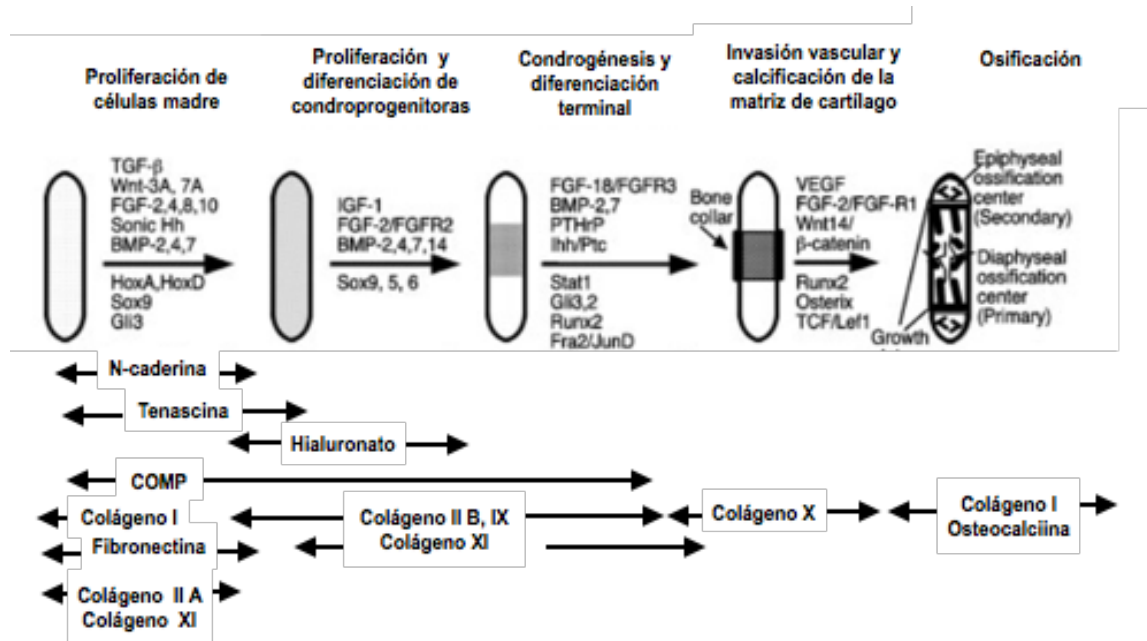


Figura 4. Secuencia de eventos en la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos. En la parte superior se observan las diferentes etapas que muestran los patrones temporales de los factores de crecimiento y diferenciación (por encima de las flechas) y los factores de transcripción implicados (debajo de las flechas). En la parte inferior se muestran las proteínas de matriz extracelular.²²

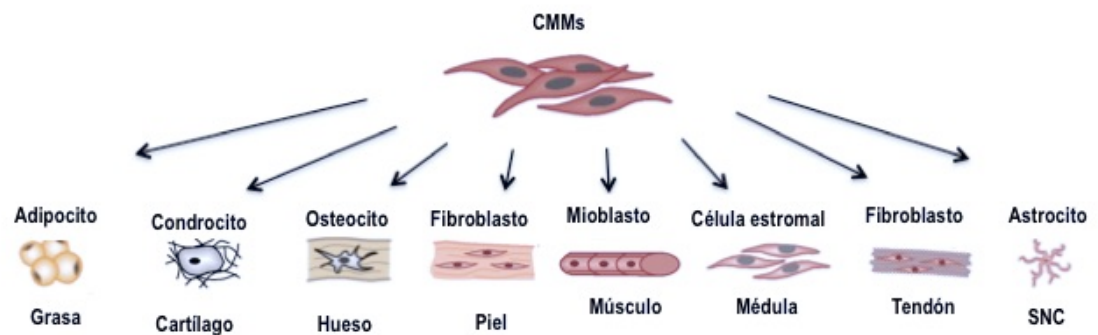


Figura 5. Potencial multilineaje de las células madre mesenquimales. CMMs tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes, tales como adipocitos, condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, mioblastos y astrocitos, que a su vez dan lugar a tejidos específicos. (SNC: Sistema nervioso central).⁵⁶

2.2.3 Andamios

EL uso de andamios se ha hecho frecuente en la ingeniería tisular para reparar el cartílago articular. Entre las características que debe tener el material están la biocompatibilidad, es decir, la capacidad de apoyar la unión de células y la migración,^{57,33} la resistencia y su estabilidad estructural. Es importante que los andamios sean biodegradables, entendiéndose por esto al fenómeno por el cual un material es degradado o solubilizado en agua por cualquier proceso en el cuerpo para eliminarlo desde el sitio implantado.⁵⁸ Los andamios tridimensionales son muy eficaces por su grado de adhesión celular y estabilidad mecánica.⁶

Existen andamios sintéticos, cuya ventaja es evitar el rechazo que pudiera derivarse del sistema inmune, además de que sus propiedades estructurales y mecánicas son controlables.⁷ Entre los polímeros más utilizados se encuentran el poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y el co-polímero poli(ácido láctico-co-glicólico), estos tienen la ventaja de degradarse por hidrólisis.^{32,59-61} Algunos estudios han demostrado potenciar la producción de proteoglucanos, la proliferación, diferenciación y maduración de condrocitos,³⁷ sin embargo el principal inconveniente es que sus productos de degradación son ácidos y partículas altamente concentradas que pueden resultar en inflamación localizada y la muerte celular.³²

La ventaja del uso de andamios naturales radica en tener una mayor interacción celular debido a la presencia de ligandos que pueden facilitar la adhesión⁷, además de promover la activación de diversas vías de activación condrogénicas. Los materiales naturales más comunes son colágeno, gelatina, lisozima, MatrigelTM, ácido hialurónico, fibrina, quitosán, agarosa y alginato.^{32,62,63} El alginato es un biopolímero natural de importancia para el presente trabajo, es derivado de las algas pardas y está conformado por bloques homopoliméricos de ácido L-glucurónico y ácido D-manurónico^{64,65}, es ampliamente usado en la biomedicina debido a su biocompatibilidad y baja toxicidad⁶⁶. Dicho material requiere el empleo de cationes divalentes gelificantes para formar una estructura en red, la cual permite atrapar a las células empleadas para promover la regeneración del tejido. Debido a que carece de receptores bioactivos para interactuar con las células, se han utilizado proteínas acopladas al alginato para potenciar la adhesión celular, como el tripéptido RGD.^{66,67,68,69,70}

Lian y col.,⁷¹ en 2010, obtuvieron andamios híbridos de colágeno-condroitín sulfato, este fue cuatro veces más concentrado que los andamios de colágeno convencionales, sus resultados en cultivo de tejido con CMMs y queratinocitos sugieren que se pueden utilizar los andamios en ingeniería de tejido de cartílago y piel. También se han hecho estudios donde se observa una regeneración de la capacidad de carga al reforzar las fibras de colágeno entrecruzándolas con colágeno-condroitín-6-sulfato.⁷²

Fragmentos derivados del tejido han sido empleados en la búsqueda de la regeneración articular, resulta importante eliminar el componente celular para evitar una respuesta inmune al ser implantados en un modelo in vivo, por lo tanto son descelularizados por diversos métodos^{73,60}. Se ha observado que ayudan a producir colágeno tipo II y PGs, además disminuyen la hipertrofia del tejido con ayuda de factores de crecimiento^{74,75}.

Se han utilizado polímeros híbridos, entre los cuales se encuentran las proteínas/polisacáridos, como el colágeno/ácido hialurónico, laminina/celulosa, gelatina/quitosano⁷⁶ y fibrina/alginate.⁶² Chomchalao y col.,⁶⁸ desarrollaron andamios a partir de fibroína de seda, fibroína de seda/colágeno y fibroína de seda/gelatina utilizando una técnica de secado por congelación. Fibroína de seda/colágeno y fibroína de seda/gelatina mostraron un gran potencial como un biomaterial para la ingeniería de tejido de cartílago.

La geometría y la microarquitectura de andamios son factores clave que determinan la adhesión y migración de las células, así como la retención de la matriz sintetizada.^{77,78} El tamaño de los poros debe ser lo suficientemente grande para permitir la migración de las células y así fomentar la producción de MEC^{79,80}, pero lo suficientemente pequeños para establecer un área de superficie grande para la adhesión celular,⁷⁸ se recomienda utilizar andamios con un tamaño de poro de 300 a 350 nm.⁷

2.2.4 Terapia Génica en la reparación del cartílago articular

La terapia génica tiene el potencial de superar los problemas asociados con la administración localizada de los factores de crecimiento. Tales problemas incluyen la corta vida media de los factores de crecimiento, el requisito potencial de la aplicación repetida, así como la mala administración del agente que resulta en la difusión del factor de crecimiento de distancia de la zona deseada.⁷⁸ Recientemente los andamios han sido desarrollados y utilizados como sistemas portadores de ADN plasmídico para

desarrollar lo que ahora se denomina como "matrices activadas por genes" que son andamios biodegradables que contienen vectores con genes que pueden provocar la expresión génica deseada.⁷

Los cDNAs potencialmente útiles para la regeneración de cartílago, comprenden miembros del factor de crecimiento transformante de la familia (TGF)- β , proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), entre otros.⁸¹ SOX9, L-SOX5, y SOX6 han sido esenciales para la diferenciación de los condrocitos y la formación de cartílago.⁸²

Existen múltiples estrategias para introducir cDNA exógeno para el tratamiento de regeneración de cartílago. Varios factores deben ser tomados en cuenta, incluyendo la extensión de la patología del cartílago, los procesos de enfermedad, y la actividad biológica del producto del gen, entre otros. Un componente clave para cualquier aplicación de la terapia génica es un vector que entregue eficientemente el cDNA de interés a la célula diana, y así permitir la expresión del transgen con la duración adecuada para afectar a la respuesta biológica deseada.^{83,84}

En general, adenovirus, virus del herpes simple, vectores de virus adeno-asociados, lentivirus y vectores no virales, pueden ser utilizados para la administración de cDNA *in vivo* y *ex vivo*. Los vectores retrovirales, a causa de su incapacidad para infectar células no activas, son más adecuados para el uso *ex vivo*. Los enfoques *in vivo* resultan más simples, más baratos, y menos invasivos, pero los virus se introducen directamente en el cuerpo, lo que limita las pruebas de seguridad.

Para aumentar la regeneración del cartílago articular, los genes terapéuticos pueden ser administrados en la membrana sinovial, o directamente a la lesión del cartílago. Administrar los genes a las células de la membrana sinovial se considera más adecuado para enfoques condroprotectores, basado en la expresión de mediadores antiinflamatorios. La transferencia génica dirigida a los defectos del cartílago se puede lograr ya sea por administración directa del vector a las células situadas en o alrededor de los defectos, o por el trasplante de células condrogénicas modificadas genéticamente directamente en el defecto.⁸⁴

2.3 ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO

La línea de investigación en la regeneración de cartílago articular se ha desarrollado bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la Dra. Herminia Martínez Rodríguez y colaboradores, en el laboratorio de terapias experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, así como en el laboratorio de Terapia Génica y Terapia Celular del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Existen 5 trabajos principales que colocaron las bases para marcar la estrategia y desarrollo del presente trabajo:

1. “Cultivo de condrocitos autólogos humanos para la implantación en lesiones articulares” por el Dr. C. Jorge Lara Arias: En este trabajo se obtuvieron condrocitos humanos a partir de una biopsia de cartílago tomada de la rodilla de un paciente de 23 años con lesión osteocondral. Los condrocitos fueron cultivados *in vitro* y se incluyeron en una matriz de fibrina para generar un implante de condrocitos autólogos, el cual fue colocado en la lesión del paciente 24 h post-inclusión celular. Se realizaron pruebas histoquímicas y de expresión génica por RT-PCR de marcadores condrogénicos. Los resultados obtenidos de la biopsia articular, mostraron la ausencia de COL I y la presencia del factor Sox9 y COL II. En el implante había presencia de COL I pero también de Sox9 y COL II. Después de 6 meses de haber sido colocado el implante, el paciente se reincorporó a sus actividades diarias, sin embargo, una biopsia tomada de la zona del injerto reveló la presencia de COL I rellenando la lesión. Sus resultados concluyen que el ICA permitió la recuperación clínica del paciente, aunque con la presencia predominante de COL I.

2. “Efecto de la expresión transitoria de hIGF-1 y hFGF-2 en condrocitos humanos incluidos en una matriz de fibrina y cultivados en un sistema dinámico” por el Dr. C. Jorge Lara Arias. En este trabajo se estimularon condrocitos humanos mediante la sobre-expresión transitoria de los factores de crecimiento hIGF1 y/o hFGF2, para posteriormente embeberlos en una matriz a base de fibrina y cultivar los implantes en un frasco “spinner” que proporcionaba un flujo dinámico. Se realizaron ensayos de Western blot (anti-IGF1 y anti-FGF2), inmunohistoquímicos (anti-colágeno I y II) y la tinción histológica safranina O para observar la síntesis de GAGs. Los resultados concluyeron que la combinación de los dos factores empleados aumenta de manera significativa la expresión de colágeno II, contrario al colágeno I, lo cual resulta favorable, además se detectaron GAGs .

3. “Desarrollo de un implante de CMM modificadas genéticamente para remplazo de cartílago” por la Dra. C. Idalia Garza: En este trabajo se construyeron vectores adenovirales que portaban el cDNA codificante para TGF- β 1, IGF-1, FGF-2 y SOX9 de *Homo sapiens* para transducir de manera individual o en combinación, CMMs derivadas de tejido adiposo proveniente de *Ovis aries* durante 28 días, con la finalidad de proponer a los factores que optimicen el proceso de diferenciación condrogénica. Se analizaron marcadores de diferenciación condrogénica por qRT-PCR y se realizó una evaluación por tinciones histológicas. Sus resultados indicaron que la condrogénesis inducida de CMMs transducidas con la combinación de genes IGF-1 y FGF-2, mediante vectores adenovirales, permite la creación de un implante de cartílago potencialmente útil para estudios en modelos animales y futuros ensayos clínicos.

4. “Análisis de un implante para cartílago de células madre mesenquimales modificadas genéticamente con factores condrogénicos en *Ovis aries*” por la M.C. Marcela Espinoza. En este trabajo se realizaron lesión en borregos para ser tratadas con un implante a base de fibrina y CMMs derivadas de tejido adiposo modificadas genéticamente por la combinación de factores IGF-1/FGF-2 durante 4 meses en los borregos (n=7). Se realizaron análisis histoquímicos (trícromico de Masson, safranina O / verde rápido, azul de toluidina) e inmunohistoquímicos (colágeno I, II y X) evaluados por la escala O’Driscoll. Los resultados concluyeron que no hubo una adecuada reparación con el implante después de 4 meses, encontrándose tejido fibrótico.

5. Análisis de expresión génica del proceso condrogénico en células madres mesenquimales transducidas con vectores adenovirales con los factores IGF1 y FGF2, por el M.C. Manuel González. En este trabajo se evaluó la expresión génica por qRT-PCR de las CMMs transducidas con la combinación de vectores IGF-1/FGF-2 en el sistema de andamiaje basado en una matriz de fibrina *in vitro*, por 28 días en cultivo. Los resultados concluyeron que el andamio de fibrina no favorecía la óptima diferenciación condrogénica, ya que alteraba los niveles de expresión de los marcadores condrogénicos analizados.

Los trabajos anteriores apuntan a la búsqueda de nuevos sistemas de andamiaje que favorezcan la diferenciación condrogénica para futuros ensayos preclínicos y clínicos.

CAPÍTULO III JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades articulares son las causales más frecuentes de incapacidad en el mundo, lo que lleva a consecuencias socioeconómicas significativas. Los resultados de los estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en los últimos años sugieren la búsqueda continua de nuevas alternativas para generar un sistema de andamiaje que permita la regeneración de cartílago articular y que sus propiedades biomecánicas sean de características similares al cartílago nativo. Resultados previos de estudios *in vitro* en el laboratorio, muestran que la co-expresión de IGF1 y FGF2 en CMMs ovinas promueve la condrogénesis; pero estudios *in vivo* e *in vitro* en los que el implante se generó en una matriz de fibrina mostraron que el implante cambia el patrón de expresión condrogénica y comprometía la regeneración presentando tejido fibroso.

Este trabajo propone crear un implante similar, de CMMs transducidas con IGF1 en una matriz nueva creada a partir de cartílago hialino bovino/alginato y definir su potencial para ensayos de regeneración *in vivo*.

CAPÍTULO IV HIPÓTESIS

La construcción de un implante a partir de cartílago bovino/alginato y CMMs transducidas con IGF-1 madurado *in vitro* por 28 días, sostiene la diferenciación condrogénica, la arquitectura celular apropiada con el poblamiento celular adecuado y la formación de matriz extracelular propia del cartílago hialino para la generación de implantes útiles en futuros ensayos *in vivo* de regeneración en lesiones de cartílago articular.

CAPÍTULO V OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la expresión *in vitro* de IGF-1 sobre la condrogénesis en un implante cultivado con CMMs ovinas y matriz de cartílago bovino en cultivo prolongado (28 días).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Generar implantes moldeables a partir de una suspensión de células madre derivadas de tejido adiposo y cartílago bovino granulado y estudiar la distribución de las células en el implante.
- 2.- Comparar el patrón de expresión condrogénica de las CMMs transducidas con IGF-1 embebidas en la matriz de cartílago granulado, contra el patrón de expresión en los grupos experimentales.
- 3.- Evaluar las características histológicas en los implantes generados en los grupos experimentales.

CAPÍTULO VI ESTRATEGIA GENERAL

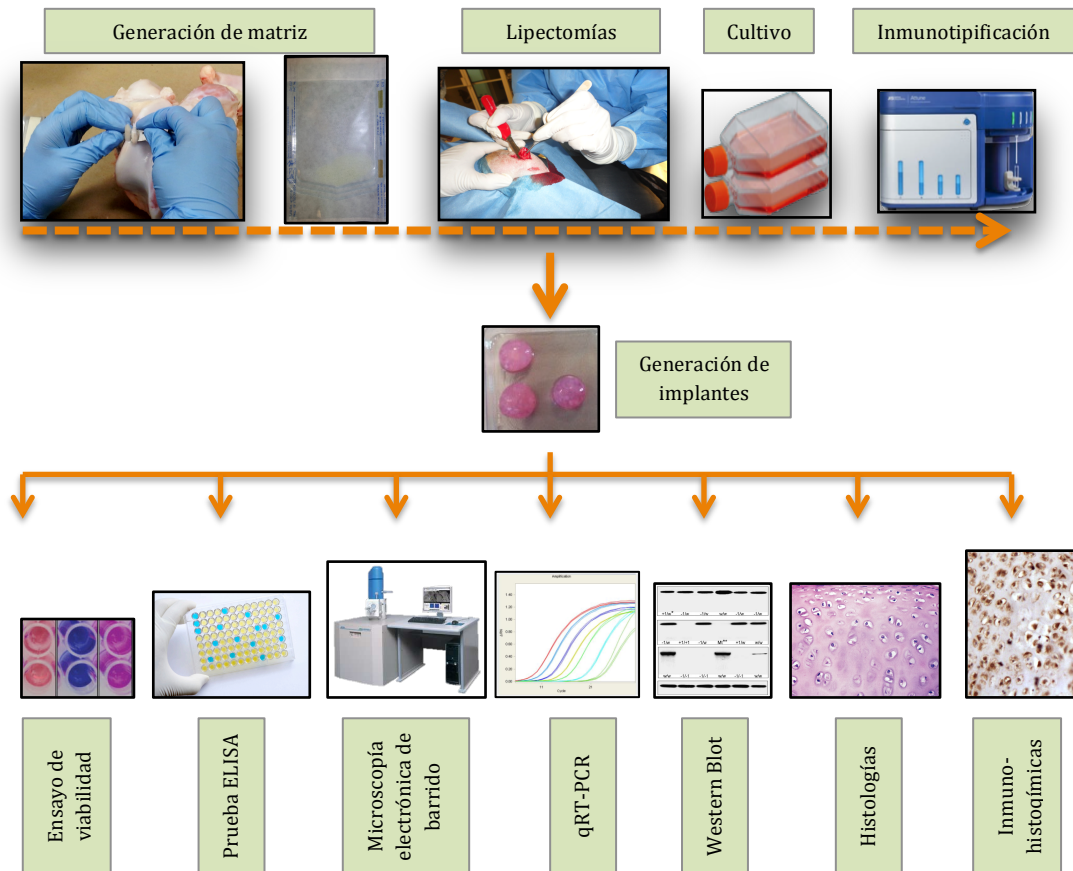


Figura 6. Diagrama de la estrategia general del proyecto. (explicación en texto)

Generación de matriz. Se obtuvo cartílago hialino a partir de rodillas de res, este fue descelularizado por métodos fisicoquímicos y esterilizado con rayos gamma.

Lipectomías. Se extrajo tejido adiposo a partir de caja torácica de *Ovis aries* todas hembras de la raza pelibuey.

Extracción y cultivo de CMMs. A partir del tejido adiposo extraído, se aislaron las CMMs por método enzimático, cultivando el infranadante obtenido en el proceso. Las CMMs se cultivaron con medio basal o condrogénico dependiendo del grupo experimental.

Inmunotipificación. Se analizaron marcadores de superficie mesenquimales y hematopoyéticos para las CMMs en tercer pasaje por citometría de flujo.

Viabilidad celular. CMMs con medio basal y CMMs con medio condrogénico fueron cultivadas en monocapa por 7 días antes de colocarse en el implante para posteriormente analizar la viabilidad celular por fluorometría los días 0, 3, 5 y 7 en el implante.

Generación de implantes. Dependiendo del grupo experimental, las células fueron cultivadas 7 días con medio basal o condrogénico antes de generar el implante, posteriormente se mezclaron los componente en una jeringa (MCB/alginato, células; o MCB/alginato, células y Ad-IGF1) y se dejó caer por gota para ser gelificado utilizando CaCl_2 .

Prueba de ELISA. Fue analizada la presencia de la proteína IGF-1 secretada en el medio de cultivo los días 0, 7 y 14 en el implante.

Microscopía electrónica de barrido. Al finalizar el cultivo se fijaron los implantes y la condroesfera en glutaraldehído, posteriormente se realizó una posfijación con tetraóxido de osmio para ser deshidratados con acetonas, finalmente fue llevado a punto crítico utilizando CO_2 y recubierto con oro, finalizado el proceso se conservaron en vacío.

Histologías. A los grupos experimentales se les realizaron tinciones histológicas como tricrómico de Masson, Safranina O/Verde rápido y H&E al día 28.

Inmunohistoquímicas y Western blot. Se analizó la presencia de colágeno I y II (COL I y COL II) en los grupos experimentales al día 28 para las inmunohistoquímicas y a los días 14 y 28 de cultivo para el Western blot.

qRT-PCR. Se realizó la extracción de RNA y la síntesis de RNA en todos los grupos, para posteriormente realizar el análisis de expresión de marcadores de diferenciación condrogénica en los días 0, 14 y 28 del cultivo.

CAPÍTULO VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico

7.1.1 Partículas virales. El vector adenoviral que se utilizó para el ensayo de regeneración condrogénica fue AdIGF-1, proporcionado por el M.C. Manuel González y la M.C. Marcela Espinoza quienes lo produjeron como parte de su tesis de maestría en el laboratorio del Dr. Augusto Rojas Martínez, estos vectores fueron contruidos por la Dra. C. Idalia Garza Veloz como parte de su tesis doctoral.

7.1.2 Borregos. Los borregos que se utilizaron fueron hembras de aproximadamente 1 año de edad de la raza pelibuey (n=3), con un peso promedio de 40 kg.

7.1.3 Matriz de cartílago bovino (MCB). Se obtuvieron 4 rodillas de res para cortar el cartílago del área de cóndilos, rótula, tróclea femoral y cabeza femoral para ser descelularizado y posteriormente usado en los implantes.

7.1.4 Implantes. Se emplearon CMMs derivadas de tejido adiposo de los borregos, aunado a esto, la matriz natural de cartílago bovino y un soporte de alginato.

7.2 Materiales y Reactivos

7.2.1 Intervención quirúrgica en borregos. Para desinfectar el material quirúrgico se utilizó KRIT (Farmacéuticos Altamirano de México, S.A. de C.V.). Para realizar las lipectomías se utilizó xilazina (Procin® Vet / Pisa S.A de C.V. México DF, México). Para cerrar los abordajes se utilizaron suturas de polipropileno (4-0, Ethicon, Inc. Somerville, NJ).

7.2.2 Cultivo celular. Para el cultivo de las CMMs mantenidas sin diferenciar se utilizó el medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's, num. cat. 15-013-CVR, Corning. Mediatech, Inc. EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (HYCLONE), tripsina al 0.25% (Invitrogen), antibiótico-antimicótico 100X (GIBCO-BRL. Grand Island, NY), L-glutamina 200mM 100X (GIBCO). Para las CMMs diferenciadas al linaje condrogénico se utilizó el medio Advance Dulbecco's Modified Eagle (num. cat. 12491-015, Invitrogen. Carlsbad, CA) suplementado, además de los reactivos anteriores, con ácido linoléico (num. cat. 013-19641, Wako. Japón), ácido L-ascórbico (num. cat. 013-19641,

Wako. Japón), L-prolina (num. cat. PB0923, BIO BASIC CANADA INC. Ontario, Canadá) y albúmina bovina (num. cat. A1312, United States Biological. MA, EE.UU.).

Entre los materiales que se utilizaron para el cultivo celular se encuentran botellas de cultivo de 25 cm² (Corning. Costar City, NY), botellas de cultivo de 75 cm² (Corning), botellas de cultivo de 150 cm² (Corning), placas de cultivo fondo plano de 6, 24 y 96 pozos (Corning), pipetas serológicas desechables de 5, 10 y 25 ml (Corning), tubos de plástico de 15 y 50 ml (Corning), tubos para microcentrífuga de 1.5 y 2 ml, criotubos de 1 ml (Corning), puntas para micropipeta de 10, 200 y 1000 µL, unidades de filtración de 500 ml (Corning). Para la extracción de células a partir de grasa se utilizó colagenasa I (GIBCO), PBS (Amresco, Solon OH), cajas petri (CELLTREAT. SHIRLEY, MA) .

7.2.3 Inmunofenotipificación de CMMs: Se utilizó tripsina 0.5X para levantar las células de la placa de cultivo, buffer de tinción (SB, Becton Dickinson Pharmingen), se analizaron los marcadores de superficie que aparecen en la tabla 1 por citometría de flujo. Para el análisis de datos se utilizó el software FlowJo versión 7.2.2 (Tree Star Inc; Ashland, OR).

7.2.4 Matriz de cartílago bovino. Para la descelularización de la matriz de cartílago bovino (MCB) se utilizó SDS (Bio-Rad. CA), PBS (Amresco), hojas de bisturí #22 (HERGOM®) y nitrógeno líquido (Praxair).

7.2.5 Elaboración de implantes y ensayos de viabilidad celular. Se utilizaron jeringas de plástico (1 ml, 27Gx13 mm, DL MÉDICA, S.A. de C.V. México), alginato (num. cat. A-2158, SIGMA), cloruro de calcio (C-7902, SIGMA), agitadores magnéticos. Para medir la viabilidad de las células en el implante se utilizó azul alamar (abD Serotec®) y placas de 24 pozos (Corning).

7.2.6 Microscopía electrónica de barrido. Se utilizó glutaraldehído 12.5% como fijador (25% EM SCIENCE. Alemania), tetraóxido de osmio (cat 18456, TED PELLA Inc.), acetona (CTR), dióxido de carbono (Praxair), sistema de recubrimiento de oro (SCD 040, Balzers union), secador de punto crítico (CPD 020 Balzers union), bomba eléctrica (LR 13758 doerr) y cámaras de vacío.

7.2.7 Prueba de ELISA. Para detectar la presencia de la proteína IGF-1 secretada al medio se utilizó el kit Human IGF-I Immunoassay, Quantikine® ELISA (R&D Systems,

Inc.) siguiendo el protocolo del fabricante, se utilizó Bradford para la cuantificación de proteínas totales

Tabla 1. Descripción de los anticuerpos empleados para citometría de flujo.

Analito	Detector	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo	Clona
Mesenquimal					
CD105	Anti-CD105 IgG1, κ	FITC	AbD Serotec	CBL418F	8E11
CD90	Anti-CD105 IgG1, κ	PE	BD Pharmingen	550402	5E10
C29	Anti-CD29 IgG1, κ	PE	Invitrogen	CD2904	MEM-101A
CD44	Anti-CD44 IgG2a, κ	PE	Chemicon	CBL154P	F10-44-2
Hematopoyético					
CD45	Anti-CD45 IgG1, κ	PE	Invitrogen	MHCD45044	HI30
CD14	Anti-CD14 IgG2a, κ	PE	AbD Serotec	MCA1568PE	TÜK4
CD34	Anti-CD34 IgG1, κ	PE	BD Biosciences	348057	8G12
Control	IgG2a, κ Isotipo	PE	BioLegend	400211	MOPC-173
Control	IgG1, κ Isotipo	PE	BioLegend	400112	MOPC-21

Tabla 2. Descripción de primers empleados en el estudio.

Gen	Num. Ref	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)
Col I	FJ200442.1	Fw. GGTGACAGGAAGTCCCAGAA	167
		Rv. CCATCGTAGGTGACGCTGTA	
Col II	X02420.1	Fw. CTAAGTGGATTGACCCCAACC	211
		Rv. TGTCTTGCTCTTGCTGATG	
Agregano (AGC)	NM_173981.2*	Fw. CAGAGTTCAGTGGGACAGCA	189
		Rv. AGACACCCAGCTCTCCTGAA	
Proteoglicano (PGC)	NM_174288.1*	Fw. TGCTGTGATTGCCTCTTTTG	169
		Rv. CCAAACCCGTAGTTCCTGA	
Biglicano (BGC)	BT021201.1*	Fw. ACCTCCCTGAGACCCTCAAT	184
		Rv. TTGTTGTCCAAGTGCAGCTC	
Proteína oligomérica de matriz de cartilago (COMP)	X74326.1*	Fw. ATGCGGACAAGGTGGTAGAC	153
		Rv. TCTCCATACCCTGGTTGAGC	
GAPDH	NM_001190390.1	Fw. CCATCACCATCTTCCAGGAGCG RV. AAGGCCATGCCAGTGAGCTTC	481

*Secuencia diseñada sobre el genoma de *Bos taurus* debido a que el genoma de *Ovis aries* no se encontraba ensamblado para este gen.

7.2.8 Aislamiento de RNA y ensayo de expresión génica. Para aislar el RNA se utilizó un sonicador, para aislar el RNA se utilizó TRIzol® Reagent (Invitrogen), citrato de sodio (sigma), cloruro de sodio (sigma), isopropanol, etanol al 100 y 70%, cloroformo, agua tratada con DEPC (Invitrogen). Para sintetizar del cDNA se utilizó SuperScript® III First-Strand (Invitrogen), tubos para PCR de 0.2 ml. Para el ensayo de expresión génica se utilizó el reactivo LightCycler® 480 SYBR Green I Master (ROCHE), los primers utilizados aparecen en la tabla 2, se usó GAPDH como gen normalizador.

7.2.9 Histología e inmunohistoquímicas. Para las pruebas histológicas se utilizó solución de Bouin como fijador, este se preparó con ácido pícrico (J.T. Baker), formaldehído (J.T. Baker) y ácido acético glacial (CTR), las muestras se deshidrataron con acetona (CTR Scientific. Monterrey, México), se incluyeron en parafina (Mc Cormick Scientific Paraplast), se utilizaron cuchillas de bajo perfil para microtomo (TBS Inc. Carolina del Norte). Para las tinciones se utilizó hematoxilina monohidratada (MERCK), escarlata biebrich (Analytika), fucsina ácida (Analytika), ácido fosfomolibdico (CTR Scientific), ácido fosfotúngstico (CTR Scientific), azul de anilina (J.T. Baker), ácido acético glacial (CTR), verde rápido (SIGMA), safranina O (SIGMA), xilol (CTR), alcohol absoluto (CTR), alcohol de 96° (CTR). Referente a las pruebas inmunohistoquímicas se realizó un desenmascaramiento de antígenos con buffer de citratos (Anexo 1) para las muestras embebidas en parafina, se utilizaron portaobjetos tratados con silano al 2% (SIGMA) y portaobjetos silanizados (DAIGGER®). Se utilizó el kit de detección Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (Abcam) (Anexo 2), los anticuerpos primarios empleados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de anticuerpos utilizados en las inmunohistoquímicas.

Anticuerpo	Fuente	Fabricante	Catálogo	Dilución
COL I	Policlonal conejo IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-28655	1:300
COL II	Policlonal conejo IgG	Abcam	Ab34712	1:500

Tabla 4. Descripción de anticuerpos utilizados en el western blot.

Anticuerpo	Fuente	Fabricante	Catálogo	Dilución
COL I	Policlonal conejo IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-28655	1:1000
COL II	Policlonal conejo IgG	Abcam	Ab34712	1:3000
Actina	Policlonal conejo IgG	Abcam	Ab16039-500	1:3000
Anticuerpo secundario-HRP	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-45043	1:3000

7.2.10 Análisis de Western blot y densitometría. Para extraer las proteínas se utilizó inhibidor de proteasas complete (cat. 11873580001, ROCHE) para sonicar las muestras, se utilizó Bradford (BIORAD) para cuantificación de proteínas totales geles mini-Protean TGX al 10% (cat 456-1033, BIO RAD), membranas de PVDF Immobilon-P (cat. IPVH00010, Millipore) y Western blotting luminol reagent (cat. sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Se prepararon buffer BSA, TBS-T, buffer de corrida y buffer de transferencia (Anexo 1). Las características de los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 4. Se utilizó el programa ImageJ para el análisis densitométrico, normalizando el ensayo con actina.

7.3 Equipos

- Campana de flujo laminar (Labconco Class II type A2. México D.F., México).
- Molino pulverizador K10 (Mezcladora Micrón S.A DE C.V).
- Sistema de multi-detección GloMax® (Promega).
- Incubadora de CO₂ Series 8000 WJ (Thermo Scientific. México D.F., México)
- Potenciómetro SevenMull (METTLER TOLEDO).
- Microtomo RM2235 (Leica. Buffalo Grove, IL).
- Microscopio PALM Microimaging GmbH (Carl Zeiss. México D.F., México)
- Termociclador GeneAmp 2400 (Perkin Elmer).
- Termociclador C1000 y sistema tiempo real CFX96 (BIO RAD).
- Lector de imágenes Cytation 3 (BioTek).
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- Microcentrifuga 5424 (Eppendorf).
- Incubadora MaxQ 4000 (Thermo Scientific).
- Mezclador Vortex-Genie®2 (Scientific Industries, Inc. EE.UU.).
- Cabina P-030-202 (C.B.S. Scientific).
- Centrífuga IEC CL10 (Thermo Scientific).
- Citómetro de flujo (Attune, Applied Biosystem)
- Balanza GX-2000 (AND).
- Placa de calentamiento/agitación CIMAREC SP131325 (Thermo Scientific)
- Microscopio electrónico de barrido JSM-6510LV (JEOL)
- Baño de flotación
- Baño de inclusión

- Secador de punto crítico CPD 020 (Balzers)
- Recubridor de oro (SCD 040, Balzers union)
- Sonicator

7.4 Metodología

7.4.1 Producción de matriz de cartílago bovino. La producción de la MCB se realizó a partir de cuatro rodillas de res. Se obtuvieron láminas de cartílago de 2 mm aproximadamente colocadas en PBS (figura 7). La descelularización de la MCB se realizó por métodos fisicoquímicos, para empezar dicha descelularización, se colocó todo el material cartilaginoso en un recipiente poroso, el cual fue sumergido en nitrógeno líquido por 5 min seguido de descongelación a 37°C en agua destilada y posteriormente un lavado con PBS por 10 min, todo lo anterior se repitió 5 veces. Posteriormente el material fue triturado en licuadora por 20 min, los fragmentos grandes se recuperaron con colador y los pequeños por centrifugación para después ser colocados en recipientes con SDS 2% por 9 h a 37°C. En seguida se lavó el material con PBS por 2 h en agitación, realizando cambios cada 30 min. Se formó una especie de masilla, la cual se mandó liofilizar bajo los parámetros del Banco de Hueso y Tejido del Hospital Universitario-UANL. Una vez que el material se liofilizó, se llevó a molienda fina con ayuda de un molino, es importante mencionar que el material estaba seco al momento de la molienda fina. Finalmente el polvo obtenido se empacó y se esterilizó con rayos gamma bajo los parámetros del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

7.4.2 Lipectomías. El protocolo de investigación que involucra la utilización de animales fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina y HU, UANL (con el número de referencia: B112-002). El área de la cirugía se rasuró y desinfectó con yodopovidona sódica para posteriormente ser colocado en un campo estéril. Los borregos fueron sedados con ketamina. A partir de una incisión de aproximadamente 5 cm, se obtuvo grasa subcutánea (5 g). Este tejido se colocó en un tubo estéril con 30 ml de buffer PBS adicionado con antibiótico-antimicótico 2% (figura 8) y transportado en hielo para su procesamiento en el laboratorio. Posteriormente la lesión fue suturada con polipropileno y los borregos se colocaron en una jaula hasta que hubiera pasado el efecto del sedante.

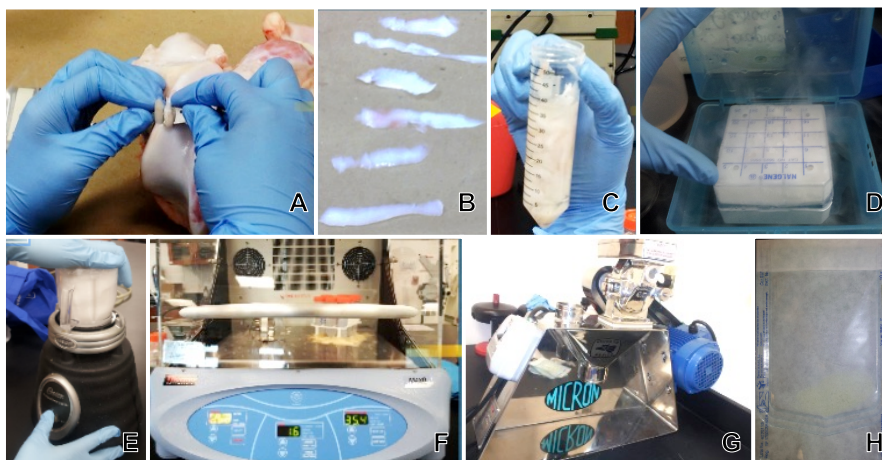


Figura 7. Producción de matriz de cartílago bovino. A) Corte de cartílago en rodilla bovina. B) Lajas de cartílago de aproximadamente 2 mm de grosor. C) Cortes de cartílago en PBS. D) Ciclos de congelación en nitrógeno líquido. E) Molienda. F) Descelularización con detergentes. G) Molienda fina. H) Producto final empacado.

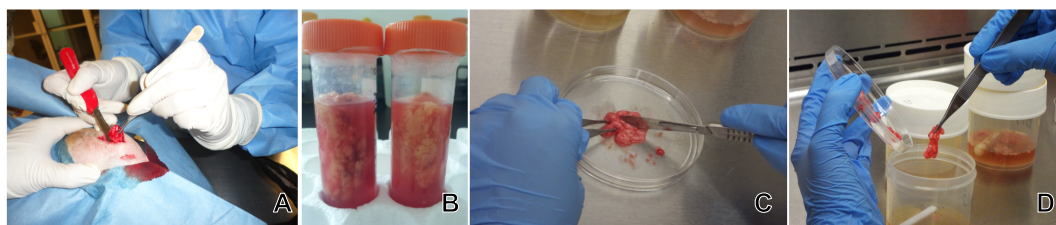


Figura 8. Extracción de tejido adiposo en borregos. A) Lipectomía en la caja torácica del borrego. B) Tejido adiposo en PBS 1X con antibiótico. C) Cortes en caja Petri del tejido extraído. D) Fragmentos del tejido digeridos en colagenasa I para aislar las CMMs.

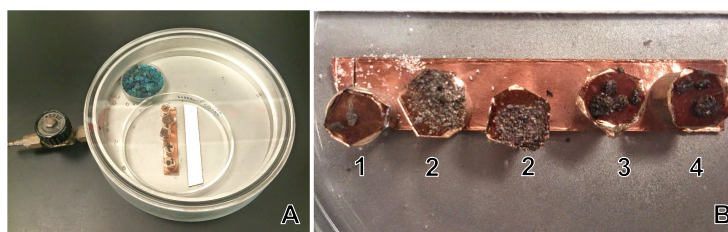


Figura 9. Almacenamiento de muestras para MEB. A) Cámara de vacío con muestras. B) Acercamiento a las muestras recubiertas con oro, 1.CE, 2.MCB, 3.I3C y 4.I2C.

7.4.3 Aislamiento y cultivo de CMMs. La grasa extraída de la caja torácica de cada animal fue cortada en fragmentos pequeños sobre una placa de Petri con ayuda de bisturí y pinzas. Este tejido se lavó con buffer PBS más antibiótico-antimicótico (Anexo 1) hasta eliminar la mayor cantidad posible de sangre y posteriormente se colocó en un recipiente de plástico estéril que contenía un agitador magnético y 10 ml de colagenasa I al 0.1% como se muestra en la figura 8 (Anexo 1), se colocó en agitación de 1 a 2 h dependiendo de la consistencia y cantidad del tejido. Posteriormente se agregaron 2 volúmenes de PBS, se agitó un poco y se esperó a que se formaran dos fases, una de grasa y adipocitos en la parte superior, y otra en la parte inferior donde se encontraban las CMMs. El infranadante fue recuperado y colocado en tubos falcon de 15 ml, estos fueron centrifugados a 2000 rpm por 6 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó por centrifugación una vez más con PBS, finalmente se resuspendió en medio para CMMs (Anexo 1) para ser sembradas e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ en cajas de 25 cm².

Al segundo día del cultivo se realizó un subcultivo a partir del sobrenadante, este se transfirió a cajas de 75 cm² con el fin de descartar células que no fueran CMMs ya que tipos celulares diferentes, suelen adherirse mas tempranamente a las cajas de cultivo. Después de 3 a 5 días se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS para retirar eritrocitos, adipocitos y restos celulares. Se mantuvo con medio para CMMs (DMEM) hasta el segundo pasaje; en el tercer pasaje dependiendo del grupo experimental, se cultivaron con medio para CMMs o condrogénico (Anexo 1).

El experimento fue dividido en 4 grupos experimentales: **CMMs**. Células madre en monocapa cultivadas con medio basal (DMEM), este grupo funge como control; **CE**. El grupo de la condroesfera (CE) fueron CMMs en monocapa cultivadas con medio condrogénico durante 28 días; **I2C**. El implante de dos componentes (I2C) fueron células madre prediferenciadas por 7 días en monocapa con medio condrogénico para posteriormente colocarlas en un cultivo tridimensional por 21 días más, entendiéndose por dos componentes al andamio bifásico de MCB/alginato más el componente celular; **I3C**. El implante de tres componentes estuvo constituido por las CMMs cultivadas con medio condrogénico y Ad-IGF1 a 100 MOI por 7 días y posteriormente se colocaron en cultivo tridimensional por 21 días más, entendiéndose por tres componentes al andamio bifásico de MCB/alginato más el componente celular, más el adenovirus. Se recambiaba sólo la mitad del medio periódicamente dependiendo de las necesidades

del cultivo (cada uno o dos días). Todos los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando aproximadamente 1x10⁶ células por pozo o implante.

7.4.4 Inmunofenotipificación de CMMs por citometría de flujo. Se utilizó un promedio de 3x10⁶ células por borrego en tercer pasaje cultivadas con medio para CMMs, las cuales se despegaron de la placa con tripsina 0.5X por 5 min a 37°C, posteriormente se inactivó la tripsina colocando el mismo volumen de medio con SFB 10%. Se obtuvo la pastilla por centrifugación a 1600 rpm por 6 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 µL de buffer de tinción por tubo. Se adicionaron 10 µL de cada anticuerpo en una dilución 1:10 y se agitó ligeramente, para después incubarse durante 20 min en oscuridad. Las muestras se lavaron con 1.2 ml de PBS 1X y se centrifugaron a 2,000 rpm (400 x g), durante 10 min a 4°C. Las células teñidas de cada tubo fueron resuspendidas en 250 µl de PBS 1X y analizadas por citometría de flujo. El análisis de datos se realizó usando el software FlowJo versión 7.2.2 (Tree Star Inc; Ashland, OR). Los controles de isotipo propios de cada anticuerpo se utilizaron para descartar las señales inespecíficas debidas al origen del anticuerpo.

7.4.5 Identificación de IGF-1 por ELISA: Se tomaron 2 ml de medio y se congeló a -80°C hasta su uso, 24 h antes de la toma de muestra se cambiaba el medio en su totalidad. Se tomó una alícuota para cuantificar proteínas totales por Bradford y 80 µL para el ensayo de ELISA. Los datos se normalizaron contra la cantidad de proteínas totales.

7.4.6 Elaboración de implantes. A las células prediferenciadas de los grupos I2C e I3C se les retiró el medio y se realizó un lavado con PBS para posteriormente levantarlas con tripsina 0.5X, incubándolas de 5 a 8 min a 37°C, después de este tiempo se inactivó la tripsina con medio suplementado con SFB y se obtuvo la pastilla por centrifugación decantando el sobrenadante (en este punto del cultivo ya había síntesis de matriz en monocapa, por lo tanto era importante recuperarla para realizar el implante). La pastilla fue resuspendida lentamente en 80 µl de alginato 1.5% (Anexo 1) por implante, evitando formar burbujas. Se cortó una jeringa de 1 ml por la parte de la boquilla, se esterilizó con óxido de etileno para posteriormente introducir la mezcla de células/alginato y el polvo de la MCB, para mezclar los 3 componentes se desplazó el émbolo a través del cuerpo de la jeringa para lograr homogenizar la mezcla. Se dejó caer la mezcla en un frasco que contenía CaCl₂ 0.102 M y se mantuvo en agitación

constante con dos pequeñas barras magnéticas por 10 min para gelificar el alginato, posteriormente se retiró el CaCl_2 y se realizaron 2 lavados con PBS por 2 min y finalmente un lavado con medio condrogénico por 3 min. Se cultivaron los implantes por 21 días más para un total de 28 días en cajas de 24 pozos. Se cambiaba la mitad del medio cada 1 o 2 días (figura 10).

7.4.7 Ensayos de viabilidad celular en el implante. Se utilizaron aproximadamente 1×10^6 células en monocapa las cuales fueron cultivadas por una semana en medio para CMMs, por otra parte la misma cantidad de células se cultivó con medio condrogénico por el mismo tiempo ($n=3$). Al día 7 se levantaron las células con tripsina 0.5X y se formó la pastilla por centrifugación decantando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 80 μl de alginato 1.5%. Se formó el implante con los 2 componentes (alginato/MCB y células) como se mencionó anteriormente y se colocaron los implantes en placas de 24 pozos. Enseguida se añadió el medio correspondiente a cada grupo, preparado con 10% de azul alamar, se dejó incubando por 3 h a 37°C y 5% de CO_2 , pasado el tiempo se colocó el medio en placas oscuras de 96 pozos para su lectura, los implantes se lavaron con PBS 1X, posteriormente se cultivaron con el medio correspondiente. La placa de 96 pozos que contenía el medio se leyeron en un espectrofluorómetro con el filtro verde de 525 nm a los días 0, 3, 5 y 7. En cada nueva lectura se cambió el implante a un pozo nuevo para que las células que se hubieran desprendido del implante no interfirieran con la lectura. Los datos se normalizaron con la lectura del medio correspondiente (sin células) que contenía 10% de azul alamar por el mismo periodo de tiempo.

7.4.8 Microscopía electrónica de barrido: En el día 28 del cultivo los implantes generados y la CE fueron fijadas con glutaraldehído 12.5% por 14 h. Posteriormente se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio 1% por 1 h en campana de humos. Las muestras se cortaron por la mitad para después deshidratarlos con dos cambios de acetonas en las siguientes concentraciones: 35, 50, 70, 96 y 100% por 10 min cada uno, finalmente se llevaron a punto crítico utilizando CO_2 y se recubrieron con oro, utilizando un espesor de 15 nm. Las muestras se conservaron en vacío hasta su observación para evitar la humedad (figura 9).

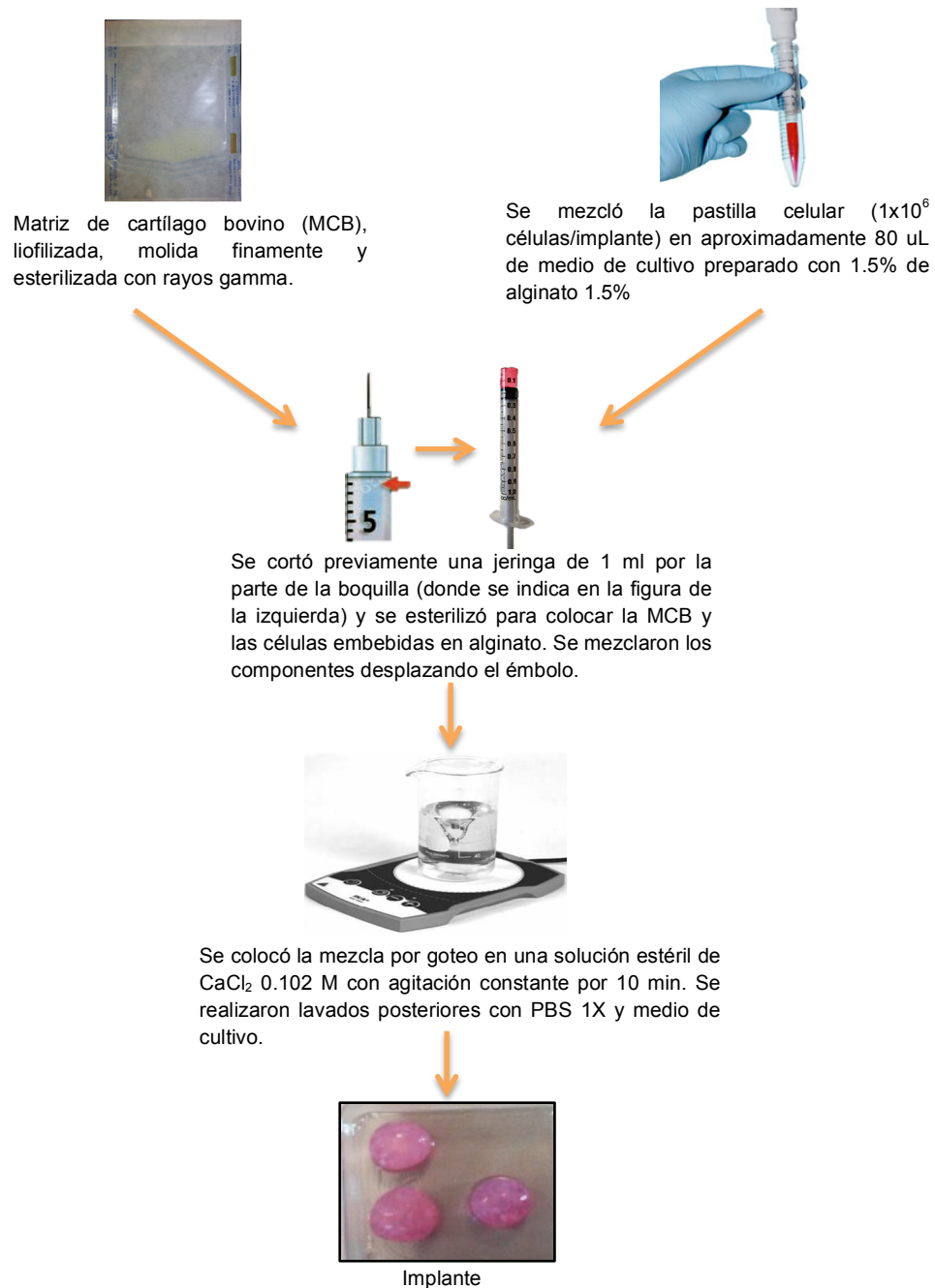


Figura 10. Esquema general de la creación de los implantes.

7.4.9 Ensayo de Western blot y densitometría: Después de 28 días en cultivo se extrajo proteínas totales, colocando las muestras en complete (inhibidor de proteasas), manteniéndolas en frío se sonicaron (30 pulsaciones, 30 segundos, 100%), posteriormente se cuantificaron las proteínas por método de Bradford, para cada grupo experimental se tomaron 30 µg de proteína total extraída con complete y se corrió un gel SDS-PAGE 10% a 100 V, se transfirió a una membrana de PVDF durante toda la noche a 4°C a 30 V; el bloqueo se realizó con BSA 6% durante 1 h a temperatura ambiente en TBST 1X. Se utilizó actina como normalizador, los anticuerpos policlonales de conejo anti-humano COL I y II (dilución 1:3000, Abcam) fueron utilizados para detectar las proteínas correspondientes. Los anticuerpos unidos se detectaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa de rábano (1:5000, Abcam). El análisis densitométrico, utilizando la expresión de actina para la normalización del ensayo, fue realizado con el software Image J.

7.4.10 Análisis histológico e inmunohistoquímico. Para el análisis histológico, después de concluir los 28 días en cultivo, los triplicados de la CE, I2C e I3C fueron fijados en solución de Bouin (anexo 1) por 14 h, posteriormente las muestras se deshidrataron gradualmente con acetonas (anexo 2) y se embebieron en parafina para realizar cortes de 5 µm. Finalmente los cortes se desparafinaron y se realizaron las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar la morfología celular, tricrómico de Masson para observar las fibras de colágena y safranina O/verde rápido para detectar la presencia de proteoglucanos sulfatados (anexo 2). Las imágenes se evaluaron con una modificación en la escala de Bern tomando en cuenta un parámetro de la escala O'Driscoll además de las inmunohistoquímicas, teniendo valores de 0 a 3, siendo 3 el más óptimo (figura 11). La distribución de estos valores se visualizaron en un mapa de calor por agrupamiento de similitud no supervisado en lenguaje R.

7.4.11 Ensayo de expresión génica: La extracción en los cuatro grupos experimentales se realizó siguiendo el método de TRIzol® (n=3) modificado para muestras con alto contenido de polisacáridos debido a la naturaleza del alginato (ANEXO 1), a pesar de que el grupo de CMMs y CE carecían de alginato se extrajo con el mismo protocolo para uniformizar resultados. Posteriormente se sintetizaron 2000 ng de cDNA por muestra utilizando oligo(dT). La qRT-PCR se realizó con 40 ng como templado del cDNA y 500 nM de primers gen-específico por reacción, en un

volumen final de 10 μ l. Las amplificaciones se realizaron con el siguiente programa de termociclador: pre-desnaturalización a 95°C por 10min, amplificación de la PCR mediante 40 ciclos constituidos por desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento a 60.5°C por 1min, elongación 72°C por 1 min. La serie de ciclos fueron seguidas por un análisis de melt-curve para verificar la especificidad de la reacción. El análisis se realizó mediante el método de $\Delta\Delta C_t$.

7.4.12 Análisis estadístico. Los datos fueron analizados mediante el programa Prisma 6.0. Para los ensayos de viabilidad celular, análisis densitométrico y qRT-PCR los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student. Los datos de tamaño de implante fueron analizados mediante una ANOVA para cada grupo experimental. Los datos de la evaluación histológica fueron analizados mediante una prueba de Wilcoxon para variables no paramétricas. Los datos fueron presentados como promedio \pm error estándar, a excepción de la evaluación histológica donde se graficó la sumatoria de los parámetros evaluados. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

PARÁMETROS	DESCRIPCIÓN	VALORES
Grupos de condrocitos	Sin grupos	0
	Algunos grupos	1
	Presencia moderada	2
	Abundantes	3
Uniformidad e intensidad de safranina O/verde rápido	No teñido	0
	Tinción escasa de matriz pobremente formada	1
	Tinción moderada	2
	Tinción intensa	3
Distancia entre las células / cantidad de matriz producida	Alta densidad sin matriz entre ellas	0
	Densidad celular alta con pequeña cantidad de matriz entre ellas	1
	Densidad celular moderada con poca matriz	2
	Baja densidad celular con distancia moderada entre las células y matriz extensa	3
Morfología celular	Condensada/necrótica/cuerpos picnóticos	0
	Fusiforme/fibrosa/estrellada	1
	Mezcla fusiforme/fibroso con células redondeadas	2
	Mayormente redondeada/condrogénicas	3
Inmunohistoquímicas		
COL I	No teñido	3
	Escasamente teñido	2
	Moderadamente teñido	1
	Intensamente teñido	0
COL II	No teñido	0
	Escasamente teñido	1
	Moderadamente teñido	2
	Intensamente teñido	3
Sumatoria		18

Figura 11. Escala de evaluación Bern/O'Driscoll empleada en el análisis histológico.

CAPÍTULO VIII RESULTADOS

5.1 Producción y descelularización de la MCB

Para la generación del andamio se partió de un biomaterial de naturaleza cartilaginosa, de fácil acceso y con un alto rendimiento de recuperación por lo que su producción fue de bajo costo. Se eligió como modelo la rodilla de bovino, ya que es un material rico en fibras de colágeno, proteoglucanos y altamente poroso. Nuestro interés fue minimizar la presencia del componente celular sin comprometer la matriz extracelular de cartílago, para ello se trató el biomaterial por métodos fisicoquímicos. La figura 12 muestra la MCB parcialmente descelularizada, donde observamos aproximadamente un 54% de lagunas vacías (flechas amarillas) y un 46% de lagunas con restos celulares (flechas verdes). Se obtuvo un total de 52.42 gr de peso húmedo partiendo de 4 rodillas de res, suficiente para realizar aproximadamente 50 implantes de 4mm de diámetro. Con la primer molienda, el producto era técnicamente no manipulable por su gran tamaño, teniendo partículas de hasta 3 mm de largo como se muestra en la figura 13, por lo tanto se molió finamente para su fácil manejo, obteniendo partículas menores a 100 μm . Finalmente se empacó en cantidades pequeñas para su esterilización y uso. Se observó la MCB por MEB donde podemos destacar que se conserva la porosidad del biomaterial y se reafirma la presencia de lagunas vacías y con restos celulares (figura 20).

5.2 Aislamiento, cultivo y expansión de CMMs.

Con base en los criterios establecidos por la ISCT (International Society for Cellular Therapy), se tomó como primera línea de selección a aquella población celular con la capacidad de adherirse a la caja de cultivo, para esto se realizó un subcultivo de las células aisladas al segundo día, con el fin de descartar células que no fueran CMMs ya que tipos celulares diferentes suelen adherirse más tempranamente a las cajas de cultivo. Las CMMs obtenidas mostraron un adecuado crecimiento celular, completando un 80% de confluencia en 2 semanas para una caja de 75 cm^2 . La morfología celular al 80% era de aspecto estrellado, alargado, fibroblastoide y con núcleo central, aspectos característicos de las CMMs (figura 14).

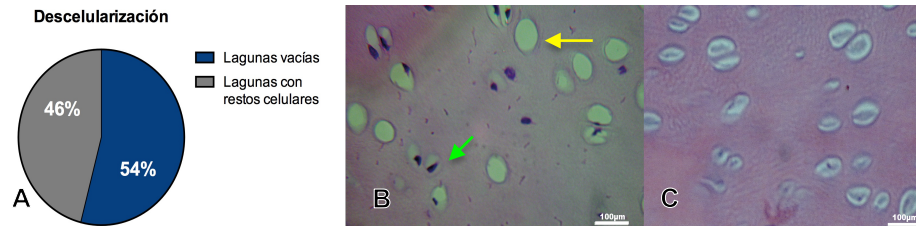


Figura 12. Descelularización de la MCB. A) Cuantificación de lagunas vacías 54%, contra un 46% de lagunas con restos celulares. B) Fragmento de cartílago post tratamiento, se muestra parcialmente descelularizado, flecha amarilla: laguna vacía, flecha verde: laguna con resto celular. C) Control negativo, cartílago sin tratamiento con detergentes. Barra: 100 µm

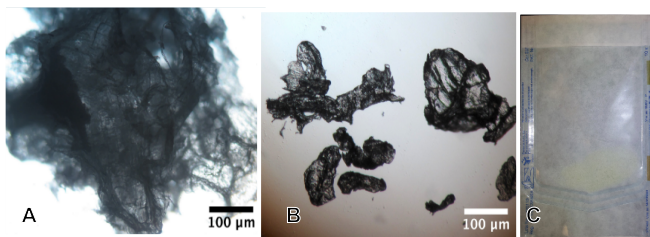


Figura 13. Dimensión de las partículas de MCB. A) MCB antes de la molienda fina, partículas de hasta 3 mm de largo. B) MCB después de molienda fina, partículas de aproximadamente 100 µm. C) Producto final empacado para esterilizar por rayos gamma.

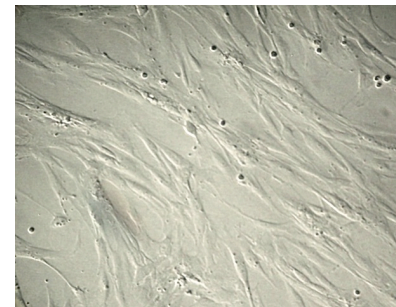
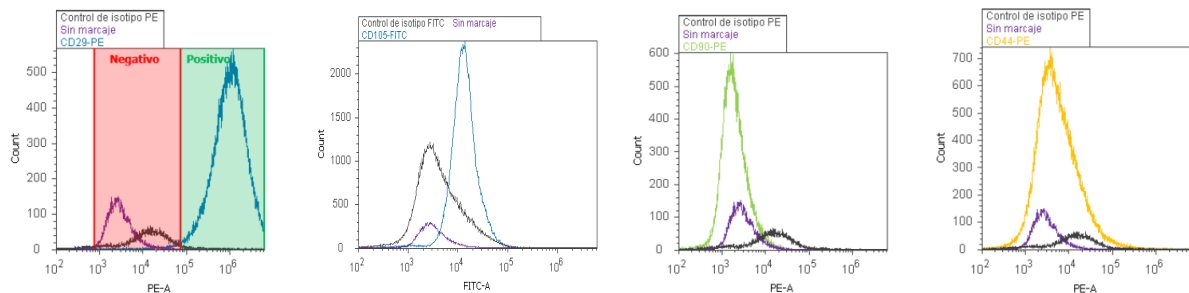


Figura 14. Cultivo de CMMs. Se observan células adherentes a la placa de cultivo con 80% de confluencia, presentando morfología estrellada, fibroblastoide, alargada y con núcleo central.

Marcadores mesenquimales



Marcadores hematopoyéticos

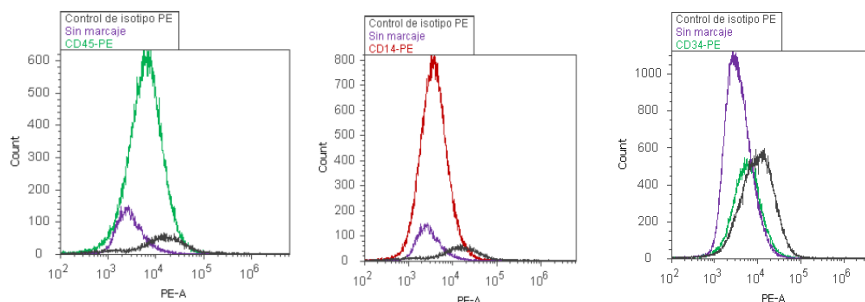


Figura 15. Histogramas del inmunofenotipo de CMMs. Se detectó la presencia de antígenos de superficie característicos de CMMs, CD29+ y CD105+; por el contrario no se detectó la presencia de marcadores de origen hematopoyético, CD45-, CD14- y CD34-, como era lo esperado.

5.3 Caracterización de CMMs por inmunofenotipo

Las células adherentes que mostraron morfología de CMMs fueron caracterizadas a través de la detección de marcadores específicos para células madre según la ISCT mediante inmunofenotipo por citometría de flujo. Se incluyeron controles negativos de isotipo propios de cada anticuerpo para descartar las señales inespecíficas debidas al origen del mismo y células sin marcar, de tal forma que si el pico de la señal marcada con el fluorocromo se sobrelapa al de los controles antes mencionados, el resultado se consideraba negativo. El inmunofenotipo mostró la expresión de los marcadores mesenquimales CD105 y CD29, y la ausencia de marcadores hematopoyéticos CD45, CD14 y CD34 como era lo esperado (figura 15). Este perfil de expresión es típico para CMM. En general, los resultados demuestran un aislamiento exitoso de CMMs.

5.4 Desarrollo de implantes, su viabilidad celular y microestructura

Para lograr una mejor manipulación técnica, la MCB se trabajó con la matriz molida finamente, además de utilizar el hidrogel de alginato para lograr una mejor retención del componente celular. Fue utilizada una jeringa para mezclar los componentes y adquirir un implante esférico (figura 16). Se observó por microscopía de luz la superficie esférica del implante, donde se pueden visualizar las células distribuidas uniformemente en el implante, adquiriendo una morfología redondeada, característica de cultivos en 3D, de igual forma se logran observar en tonos marrones las espículas de la MCB embebidas en la estructura lisa y traslúcida del hidrogel de alginato (figura 16). Se realizó una tinción con H&E para visualizar las células dentro de la matriz, estas se distinguen redondeadas y teñidas de morado, se aprecian dos tipos de matrices, una con características más acidófilas en tonos rosados, la cual corresponde a la MCB y otra más basófila en tonos púrpuras, la cual corresponde al hidrogel de alginato con sus redes características conocidas como “cartón de huevo” (figura 17). Los datos anteriores sugieren que las células se distribuyen homogéneamente y logran quedar atrapadas en el andamio.

Para el análisis de viabilidad celular en el implante, nos cuestionamos qué metodología de cultivo en monocapa resultaría más apropiada para un posterior cultivo tridimensional, optando por el uso de CMMs prediferenciadas con medio condrogénico por 7 días, o simplemente CMMs cultivadas con medio basal 7 días previo al ensamble del implante. Los resultados del estudio espectrofluorométrico muestran que

aproximadamente un 50% de las células se mantuvieron viables dentro de los primeros 3 días, sin embargo el grupo prediferenciado y cultivado con medio condrogénico mostró un aumento significativo en la viabilidad celular a partir del día 5 en comparación con las células cultivadas con medio basal (figura 18). En base a estos resultados se decidió usar tal metodología de cultivo para los posteriores implantes.

Para analizar las propiedades ultramicroscópicas del implante se observó por MEB al día 21 de cultivo en el implante (figura 20). Se puede apreciar en el grupo de la CE dos tipos de texturas, una fibrosa que corresponde a la MEC y otra lisa que corresponde al componente celular. En los grupos I2C e I3C se puede observar la interacción de la MCB con el microambiente, la morfología celular se mantiene esférica, además de observarse colonias de células que interactúan entre sí. De manera interesante se logró observar la presencia de filopodios en el I3C, lo que nos habla de una célula activa que pretende migrar hacia un sustrato afín, así como lo que parecen ser indicios de lagunas características de los condrocitos.

5.5 Presencia de la proteína IGF-1 en el medio de cultivo

Para evaluar la actividad del Ad-IGF1 se analizó por ELISA la presencia de la proteína IGF-1 secretada al medio de cultivo. Se observó una diferencia significativa en la secreción de esta proteína al día 7 de cultivo en el implante para el grupo I3C en comparación al I2C, indicando que el adenovirus se encontraba activo y ayudando a la sobreexpresión de esta proteína. Para el día 14 de cultivo en el implante los valores caen a niveles basales, la proteína también se expresó en el grupo I2C que carece del adenovirus debido a que las CMMs tienen una expresión intrínseca basal de IGF-1 (figura 19).

5.6 Cultivo de implantes

Como se definió en el ensayo de viabilidad celular, las células se cultivaron por 7 días con medio condrogénico para prediferenciarlas, en este tiempo se observaron cambios en la morfología celular, pasando de fibroblastoide a redondeada, además del aumento en la densidad del cultivo como resultado de la síntesis de MEC. Aproximadamente al día 5, el cultivo en monocapa sufrió una retracción paulatina hacia el centro de la caja de cultivo, liberándose progresivamente del anclaje a la periferia de la caja, como se puede observar en la figura 21. Debido a esto, al día 7 se levantaron las células del

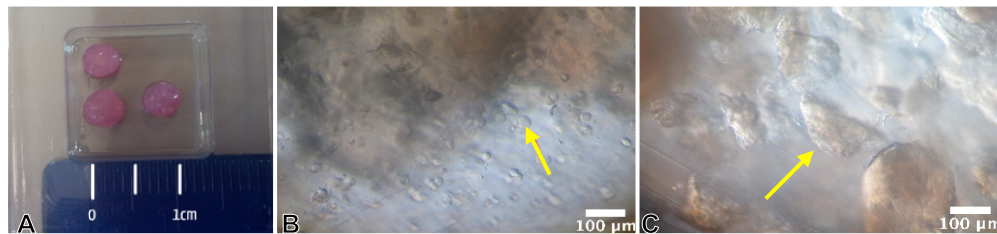


Figura 16. Implantes. A) Se observan implantes esféricos de aproximadamente 4 mm de diámetro. B) Implante observado en microscopio de luz donde se distinguen las células con morfología esférica distribuidas homogéneamente sobre la superficie. C) Implante sin componente celular, se observan las espículas de la MCB en tonos marrón, mientras que el hidrogel de alginato es liso y traslúcido.

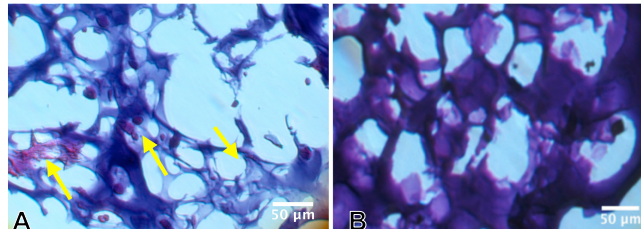


Figura 17. Corte histológico del implante. A) Corte histológico con tinción de H&E, se observa en tonos rosados la MCB y en tonos púrpuras el hidrogel de alginato, así como el componente celular. B) Corte histológico con tinción de H&E del hidrogel de alginato, se observa la red característica con forma de "cartón de huevo". Cortes al día 1 de cultivo.

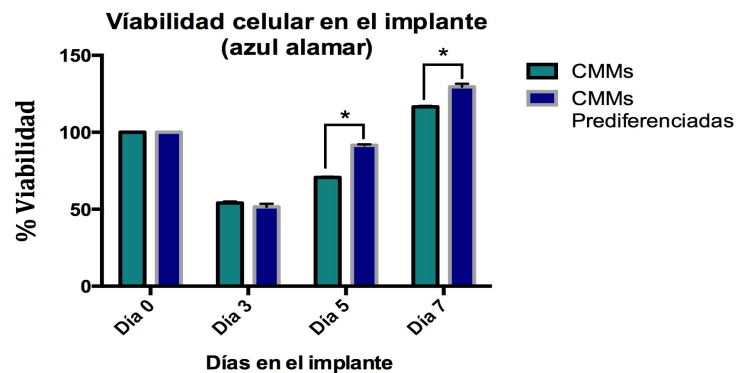


Figura 18. Viabilidad celular en el implante. Se observa un decremento en la viabilidad celular de aproximadamente un 50% para el día 3 en ambos grupos, sin embargo a partir del día 5 aumenta significativamente para el grupo de células prediferenciadas con medio condrogénico.

ELISA IGF-1

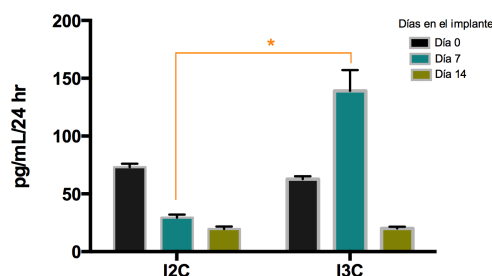


Figura 19. Secreción de la proteína IGF-1 al medio de cultivo. Se observa una diferencia significativa al día 7 de cultivo en el implante para el grupo I3C Vs I2C. La expresión cae a niveles basales para el día 14 en ambos grupos. (*) $p < 0.05$

cultivo en monocapa para formar el implante, ya que en este punto las células se encontraban metabólicamente activas sintetizando la MEC. Si se deja este cultivo en monocapa, como es el caso del grupo CE, aproximadamente al día 10 se forma una microesfera de manera natural (figura 22). Era importante revisar que esto no sucediera para los grupos I2C e I3C. Se observó un aumento significativo en el tamaño del implante en el día 28 respecto al día 14 para el grupo I3C (figura 23).

5.7 Análisis de la expresión de marcadores condrogénicos

Se analizaron los perfiles de expresión de genes asociados con la diferenciación condrogénica, debido a la naturaleza del alginato, la literatura sugiere el uso de cationes divalentes no gelificantes (citrato de sodio) para romper la estructura debido a que clusters de células quedan atrapados en el alginato obteniendo bajos rendimientos en la concentración del RNA, el uso de esta sal implicó tener una muestra con una relación 260/230 no óptima para la posterior síntesis de cDNA y por lo tanto el ensayo de qRT-PCR. Únicamente el tiempo 28 tuvo una mejor relación 260/230 por lo que se trabajó con estas muestras para los ensayos.

Las curvas de disociación indican la especificidad de los primers en la reacción al obtener un solo pico para todos los genes analizados (figura 24). El análisis de los datos no mostró diferencias significativas entre los grupos para los genes analizados, únicamente un aumento significativo en el grupo CE Vs I3C en el gen de COL II (figura 25), por lo que se decidió evaluar este marcador a nivel transcripcional por ensayo de Western blot

Se analizó la presencia de los marcadores COL I y II a nivel traduccional por Western blot (día 14 y 28 de cultivo) e inmunohistoquímica (día 28 de cultivo). Una parte importante de la regeneración del cartílago hialino es la producción de colágenos tipo II, por otra parte la presencia de COL I denotaría fibrosis lo que no es deseable en el proceso regenerativo. Los resultados del análisis densitométrico muestran la presencia de COL I únicamente en el grupo control CMMs, es favorable que los implantes generados carezcan de esta proteína. A pesar de una mayor expresión de COL II en el grupo I3C vs I2C, este aumento no resulta significativo para el día 28 de cultivo (figura 26). En las pruebas inmunohistoquímicas se observó la presencia de COL I en tonos marrón para el grupo CE, sin embargo se presenta a nivel de núcleo y citoplasma, no en la matriz extracelular neoformada, indicando que es una proteína inmadura, lo que

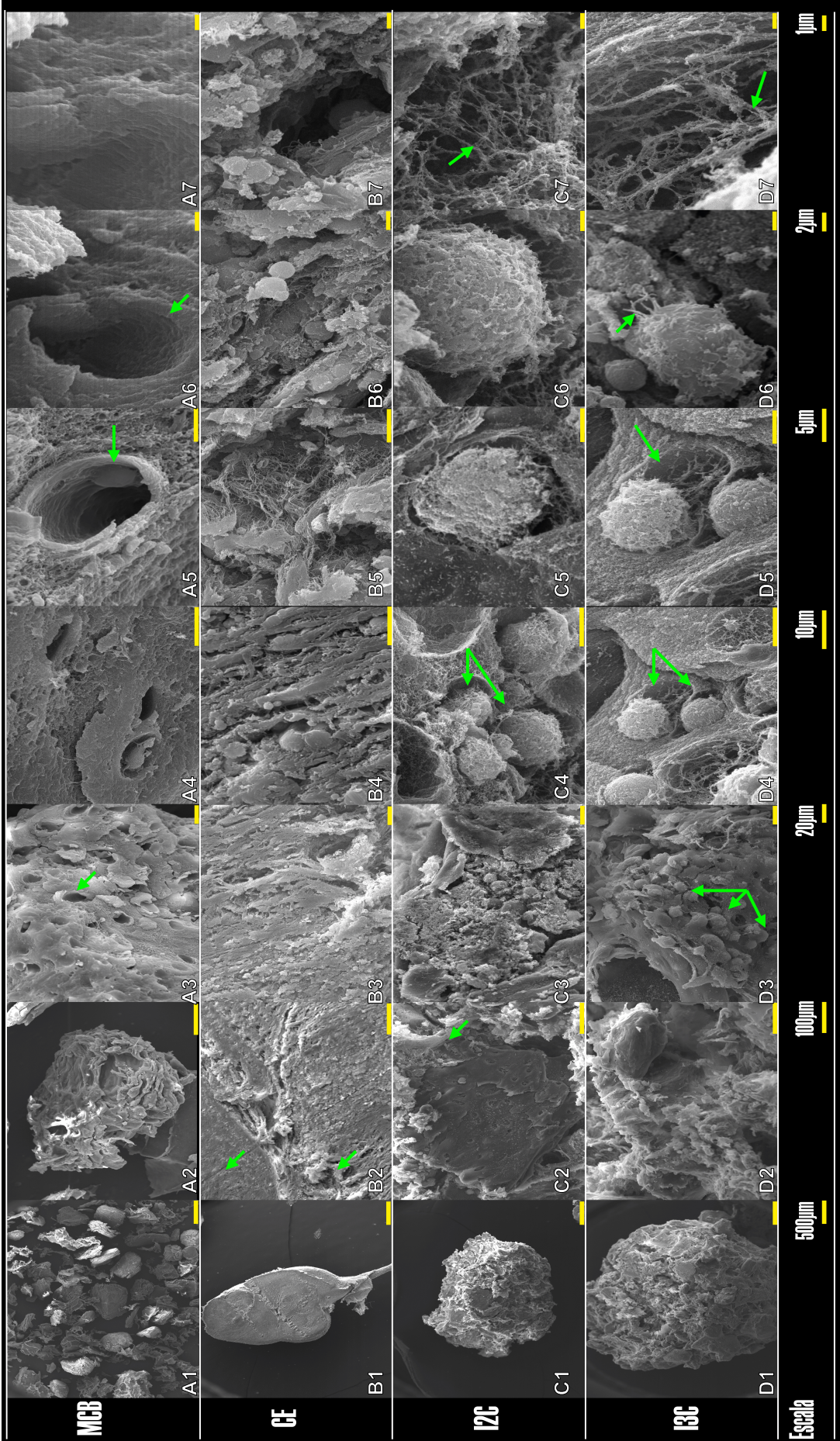


Figura 20. Microestructura por microscopía electrónica de barrido. A3) Porosidad conservada en la MCB, A5) Laguna con restos celulares, A6) Laguna vacía, B2) Textura fibrosa (MEC) y lisa (células), C2) Interacción de la MCB con la MEC; D3) Colonia de células con morfología ovoide, C4) y D4) Grupos de condrocitos, D5) Indicis de lagunas, C6) Célula de morfología ovoida, D6) Presencia de filopodios, C7) y D7) Fibras de la MEC.

lo que resulta favorable; se detecta también COL I para los grupos I2C e I3C en la misma región y en la matriz neoformada con una leve tinción. Respecto a COL II el grupo CE tiene una leve tinción en la matriz neoformada encontrándose una mayor señal a nivel de núcleo y citoplasma, el grupo I3C e I2C tienen una intensidad de tinción muy similar entre ellos para esta proteína. El grupo CMMs se utilizó como control basal. Para los negativos de cada grupo experimental fue omitido el anticuerpo primario (figura 27).

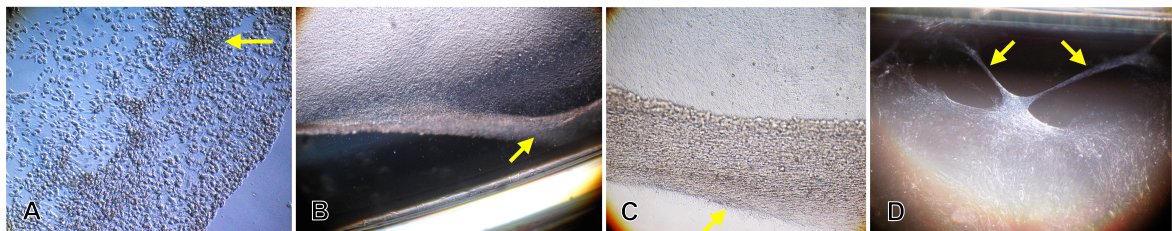


Figura 21. Desarrollo del cultivo en monocapa con medio condrogénico . A) Células en monocapa con morfología redondeada y aumento en la densidad celular (clusters de células, marrón), día 3 aproximadamente. B) Doblez producto de la retracción de las células con la MEC hacia el centro de la caja, día 6 aproximadamente, se observan campos claros por ausencia de células. C) Aumento en la densidad del cultivo debido al dobléz y retracción hacia el centro de la caja. D) Liberación progresivamente del anclaje a la periferia de la caja. B), C) y D) No se observan claramente las células debido a que se encuentran embebidas en la MEC que están produciendo.

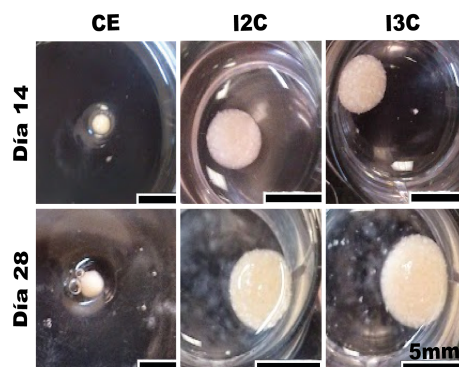


Figura 22. Cultivo de implantes y CE. Se observa un aumento del tamaño de los implantes para el día 28 de cultivo. La forma del grupo CE se genera de manera natural al interactuar las células en monocapa. Barra: 5 mm

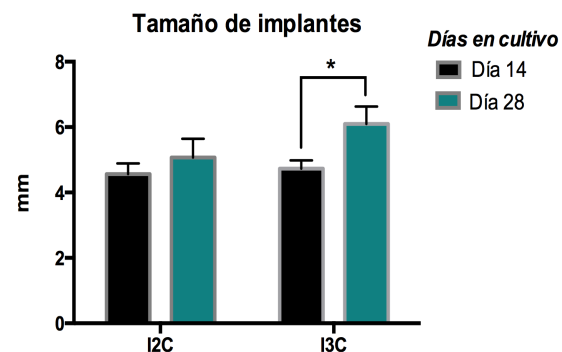


Figura 23. Tamaño de implantes. Para el día 14 de cultivo el tamaño entre los implantes es de aproximadamente 4.5 mm para ambos grupos, sin embargo a un aumento significativo de aproximadamente 2 mm para el día 28 de cultivo en el grupo I3C. (*) $p < 0.05$

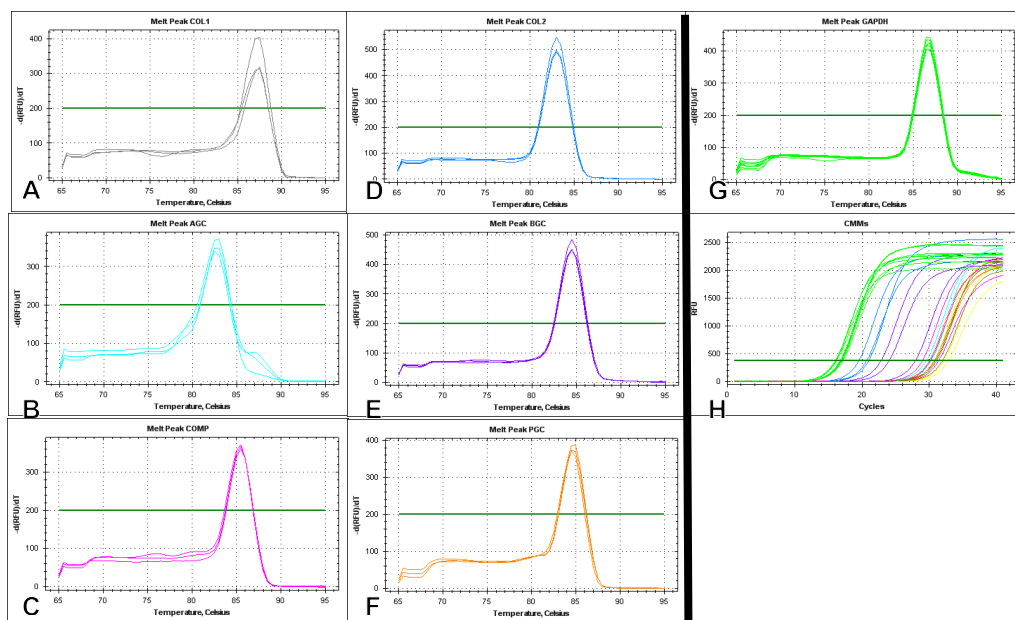


Figura 24. Curvas de disociación y gráfico de expresión en ensayo de expresión génica. A)-F) Curvas de disociación para los genes analizados, indicando la especificidad de la reacción. G) Curva de disociación del control endógeno GAPDH. H) Curva de cuantificación del grupo control CMMs utilizado para normalizar. Las reacciones se realizaron con 40 ng de cDNA por triplicado.

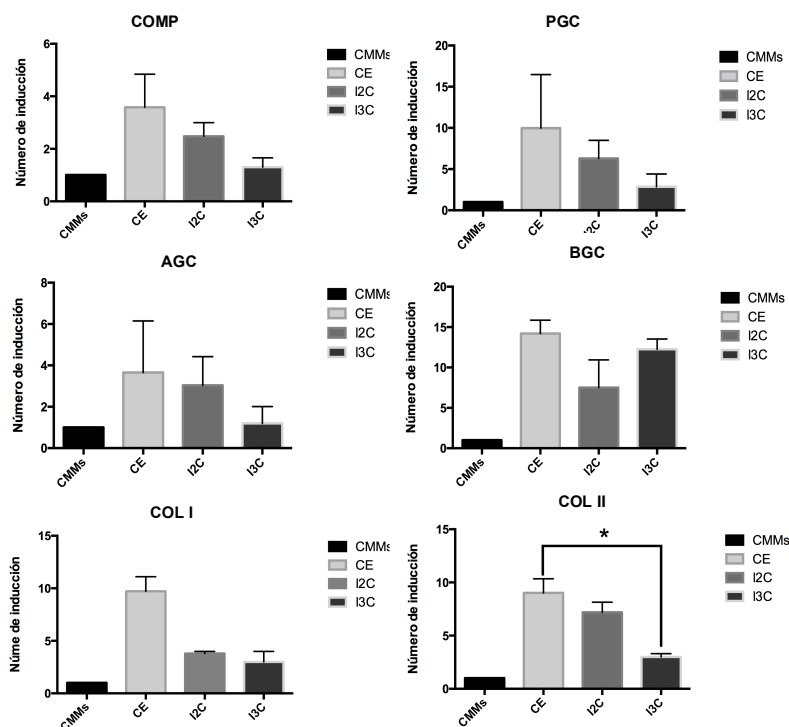
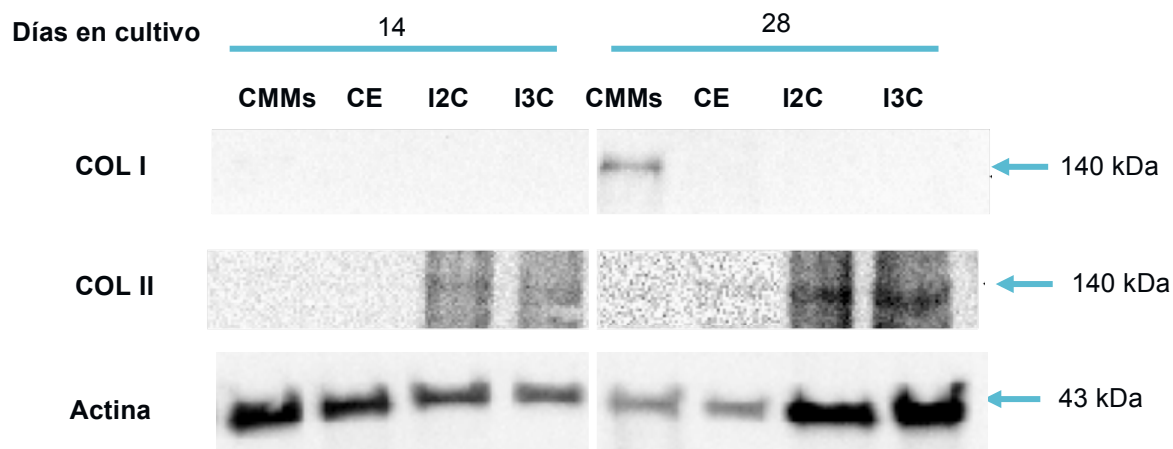


Figura 25. Expresión génica de marcadores condrogénicos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión para los marcadores analizados, únicamente para el gen del colágeno II en el grupo de la CE Vs I3C. Los niveles de expresión de cada gen blanco fueron normalizados con el gen endógeno GAPDH. Los valores están expresados como niveles de inducción correspondiente a la media con error estándar de los niveles de expresión normalizados con el grupo CMMs. Diferencias estadísticas entre los grupos de estudio fueron analizadas utilizando la prueba t de student, las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$ (*).

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

A



B

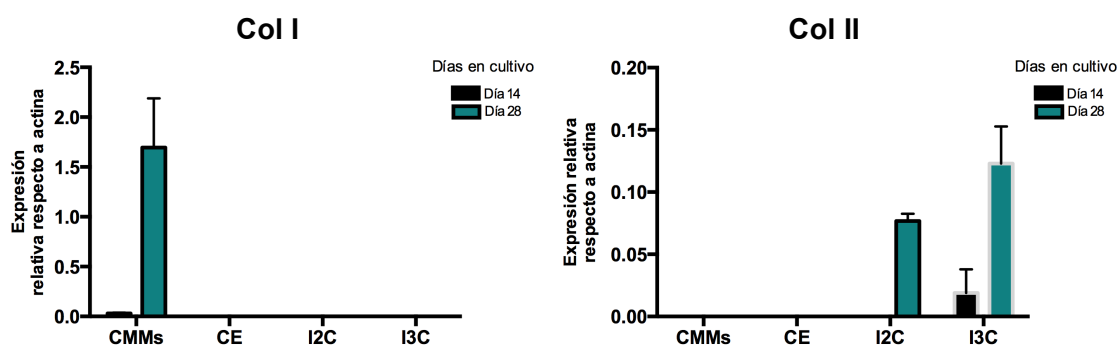


Figura 26. Análisis de marcadores por Western blot y densitometría. A) Análisis por western blot al día 28 de cultivo, Colágeno I se encuentra presente únicamente en el grupo control CMMs, Colágeno uno se expresa mayormente en el tiempo 28 para los grupos I2C e I3C, se utilizó actina como normalizador. B) Análisis desitométrico representado como expresión relativa respecto a actina, COL I es expresado en CMMs. A pesar de que COL II es mayor en el grupo I3C en el día 28, esto no es estadísticamente significativo respecto al valor en el grupo I2C. (*) $p < 0.05$

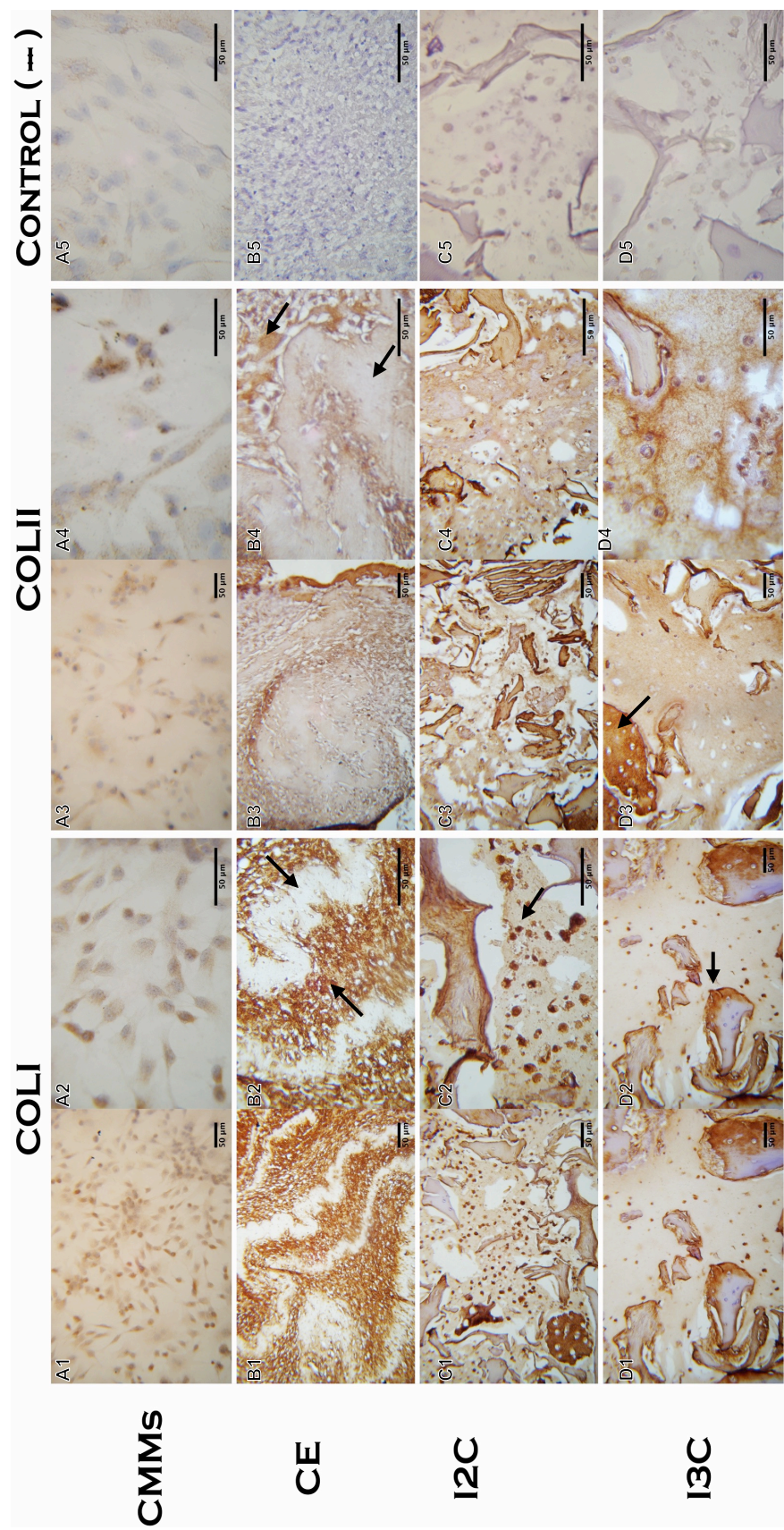


Figura 27. Inmunohistoquímica. B2) Colágeno I en tono marrón a nivel de núcleo y citoplasma, matriz neoformada tono claro. B4) Presencia de colágeno II en tono marrón a nivel de núcleo y citoplasma, la matriz neoformada está levemente teñida. C2) Tinción intensa a nivel de núcleo y citoplasma para colágeno I. D2) Se observan fragmentos de la MCB con presencia de colágeno I en la periferia, tinción leve en matriz neoformada. D3) Se observa fragmento de MCB con tinción intensa de colágeno II además de tinción moderada de la matriz neoformada, la tinción entre los grupos I2C e I3C para colágeno II es similar. C3) Se observa mayor espaciado y menos interacción entre los componentes del implante a comparación de D3. A5, B5, C5 y D5) Controles negativos para cada grupo experimental omitiéndose el anticuerpo primario. Grupo CMMS representa un control de cultivo basal. Barra: 50 µm.

5.8 Evaluación histológica

Mediante los análisis histológicos se puede identificar la arquitectura del tejido, morfología y por lo tanto, la naturaleza de las células que lo componen. Una parte importante en la regeneración del cartílago hialino es la producción de fibras colágenas, identificadas con la tinción de tricrómico de Masson en color azul y la producción de proteoglucanos sulfatados, identificados por la técnica de safranina O/verde rápido en color rojo. Las tinciones (figura 28) muestran una matriz más densa para el grupo I3C a comparación del I2C, esta matriz neoformada logra interactuar de manera más estrecha con las partículas de la MCB, para ambos grupos se observaron algunos grupos de condrocitos. Únicamente en el grupo CE se lograron identificar fibras de colágena, lo que coincide con la textura fibrosa de las ultramicroscopías por MEB, sin embargo este grupo tiene una muy baja cantidad de proteoglucanos. De manera importante se observa una tinción intensa para safranina O/verde rápido, denotando la presencia de gran cantidad de proteoglucanos para el grupo I3C, en este grupo se observa una menor celularidad, lo que significa que la distancia entre las células es mayor debido a que existe una mayor, cantidad de matriz neoformada.

El objetivo final de la ingeniería tisular es poderla aplicar en una terapia de reemplazo para lograr la reestructuración de la arquitectura del tejido. Existen diferentes escalas de evaluación histológica para determinar la naturaleza del tejido neoformado in vitro, para este trabajo se tomó en cuenta la escala de evaluación de Bern junto con un parámetro de la escala O'Driscoll así como las pruebas de inmunohistoquímica para COL I y II, el puntaje para cada parámetro evaluado va de 0 a 3, siendo 0 el peor resultado y 3 el resultado más óptimo que indica un tejido similar al cartílago hialino (anexo 3). Con los valores numéricos de estos parámetros evaluados se generó un mapa de calor por agrupamiento de similitud no supervisado (figura 29) para visualizar la distribución de las variables, se observa que entre los grupos experimentales éstas se comportan de manera diferente, el color rojo denota un puntaje mayor en la escala de evaluación y los colores claros un puntaje menor. Existen dos parámetros para los cuales difieren los grupos I3C e I2C, estos son en la presencia de COL I y en la distancia celular y cantidad de matriz, teniendo mayor puntaje el grupo I3C.

De un total de 18 puntos el I3C obtuvo 16, I2C obtuvo 14 puntos, CE obtuvo 7 y el control de cultivo basal obtuvo 3.33 puntos. La sumatoria de los parámetros evaluados

se graficó y los datos se analizaron por prueba de Wilcoxon para variables no paramétricas, resultando con significancia estadística el grupo I3C en comparación con I2C con una $p < 0.05$, lo que significa que el I3C posee características más similares a un tejido nativo (figura 30).

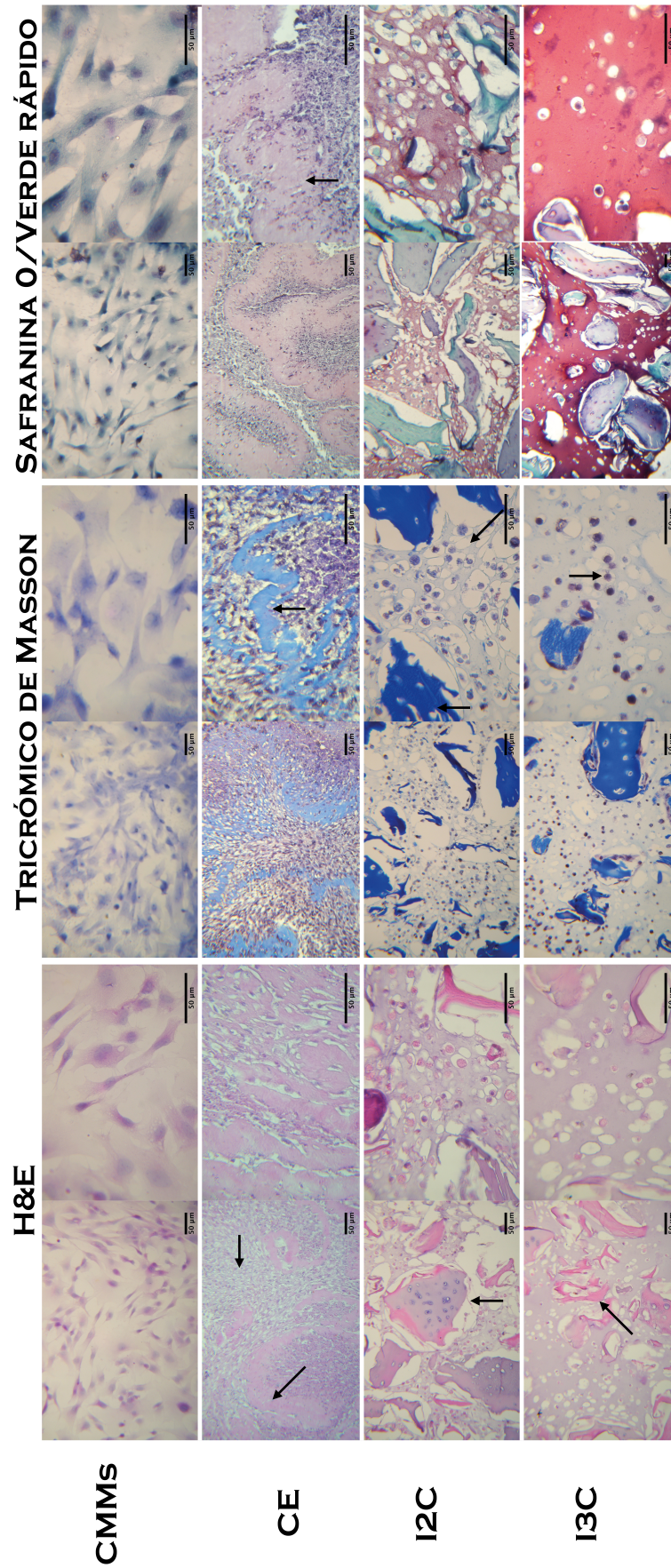


Figura 28. Tinciones histológicas. H&E: Se aprecian dos tipos de estructura para CE una lisa y una fibrosa, al igual que en las ultramicroscopías por MEB; I2C se señala un fragmento de MCB rodeado ligeramente por la matriz neoformada, la celularidad en este grupo es alta; I3C la matriz neoformada es más densa e interactúa más cercanamente con los fragmentos de MCB, la celularidad en este grupo es menor. Tricrómico de Masson: Tinción que identifica fibras colágenas, en el grupo CE podemos apreciar que la textura fibrosa corresponde a estas fibras en color azul y la textura lisa corresponde al componente celular; I2C Se observan fragmentos de MCB fuertemente teñidos en azul y presencia de algunos grupos de condrocitos, tinción pobre de las fibras de colágena en la matriz neoformada; I3C Se observan algunos grupos de condrocitos y tinción pobre de las fibras colágenas en matriz neoformada. Safranina O/verde rápido: Tinción que identifica proteoglicanos sulfatados en color rojo, en el grupo CE existe una presencia muy pobre de estos compuestos, sin embargo de manera notoria el grupo I3C presenta una tinción intensa, aun mayor que el grupo I2C. El grupo CMMS es un control de cultivo basal.

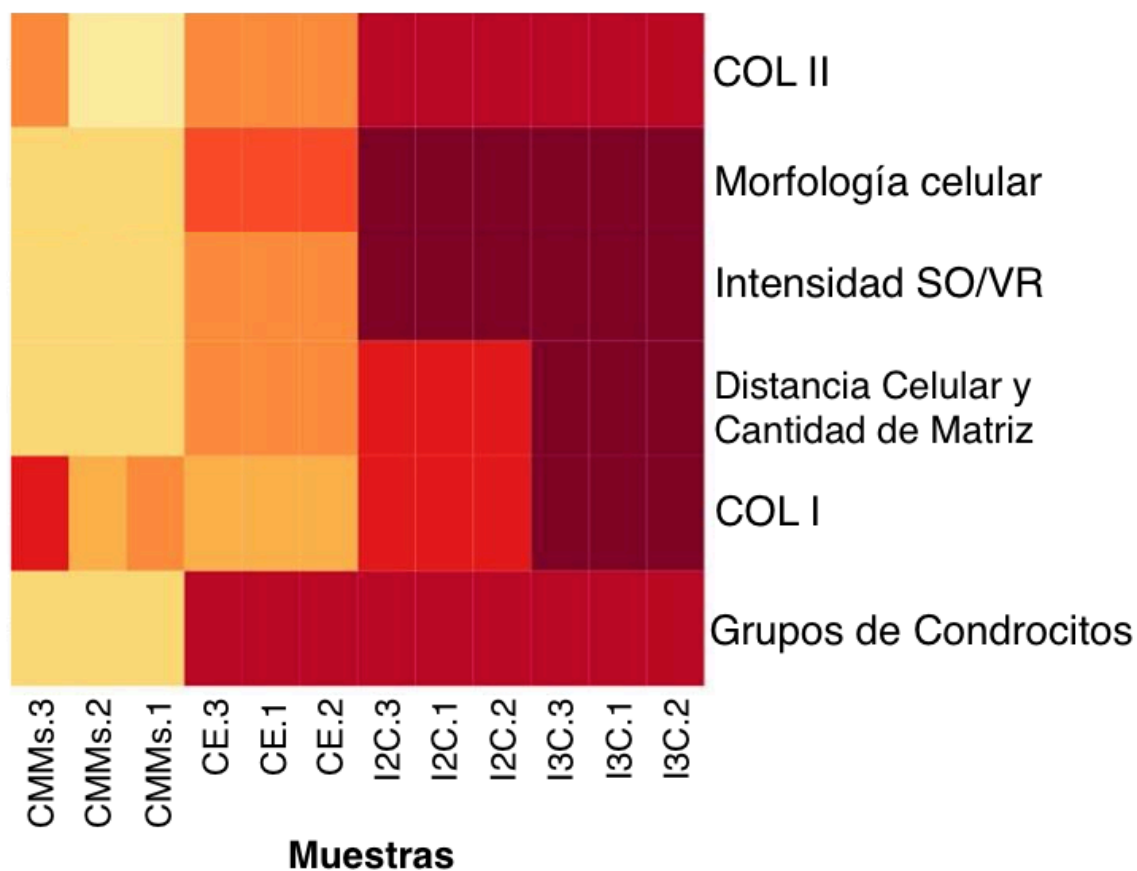


Figura 29. Mapa de calor por agrupamiento de similitud no supervisado. Mapa de calor generado con los datos obtenidos de la evaluación histológica, colores fuertes significan puntajes más altos en la escala de evaluación mientras que los colores claros significan valores bajos. Los grupos I2C e I3C varían en dos parámetros, COL 1 y distancia celular y cantidad de matriz, resultando mejor el I3C.

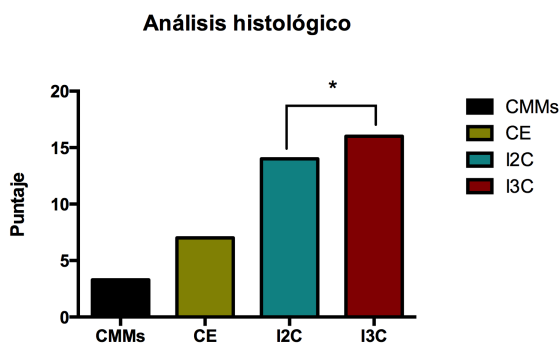


Figura 30. Análisis histológico. Sumatoria de los parámetros evaluados para cada grupo experimental, de un total de 18 puntos: I3C obtuvo 16, I2C obtuvo 14, CE obtuvo 7 y el control de cultivo basal CMMs obtuvo 3.33. I3C es más similar a un tejido de cartílago nativo, con significancia estadística contra I2C, (*) $p < 0.05$

CAPÍTULO IX DISCUSIÓN

9.1 Descelularización de la MCB

Primordialmente se buscó un biomaterial natural de fácil acceso y manipulable, siendo los fragmentos derivados del cartílago bovino un material conveniente y de bajo costo. Pensando en futuras aplicaciones preclínicas y clínicas resultaba importante reducir la presencia del componente celular en la MCB para evitar posibles reacciones inmunes de rechazo o inflamatorias en modelos *in vivo*⁸⁵. Por tal motivo se implementó por primera vez en el laboratorio una técnica para descelularizar el cartílago articular. Con la descelularización, no solo se buscaba eliminar los condrocitos, sino también aumentar la porosidad para facilitar la transferencia de nutrientes, productos de desecho y la migración de las nuevas células a usar.⁸⁶

Chang y col.⁷⁴, desarrollaron una técnica de descelularización de cartílago basada en métodos enzimáticos (DNasa y RNasa) y tritón X-100 al 1% durante 12 h de incubación, donde refieren haber eliminado casi por completo el componente celular, con un remanente del 12%. En nuestro trabajo no probamos métodos enzimáticos ya que la literatura señala que son más difíciles de eliminar, pudiendo causar respuestas inmunes de rechazo o inflamatorias^{87,85}; respecto a esto, Chang y col., discuten que los resultados de la muerte celular en sus análisis de citotoxicidad, pueden deberse a los remanentes químicos del método utilizado.

Yang y col.,⁸⁶ utilizaron fragmentos derivados de cartílago y los descelularizaron por métodos enzimáticos (deoxirribonucleasa I y ribonucleasa A) por 12 h y tritón X-100 1% por 12 h, revelando una completa ausencia del componente celular. Después de implantarlo por 4 semanas en un ratón logran detectar por técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, la presencia de proteoglucanos y una expresión leve de col II, sin embargo, la matriz generada tiene grandes huecos (desde un inicio) que no lograron ser rellenados después de su implantación en el modelo *in vivo*, esto es producto de la técnica de descelularización utilizada, lo cual no es deseable.

Debido a la estructura compacta del cartílago y la baja penetrabilidad de soluciones, se optó por métodos fisicoquímicos para su descelularización, basándonos en el protocolo propuesto por Tavassoli y col.,⁶⁰ en este se describen ciclos de congelación/descongelación y tratamientos con diversas concentraciones de dodecil

sulfato de sodio (SDS), sus resultados concluyen que someter al cartílago de 5 a 8 h en SDS 2%, seguido de 3 h de SDS 4% tiene un efecto significativo en el proceso de descelularización. En este trabajo optamos por utilizar SDS 2% durante 9 h para no comprometer la densidad de la MCB, sin embargo no fue posible eliminar por completo el componente celular, lo que sugiere que concentraciones bajas de SDS a tiempos prolongados logran preservar la MEC aunque con una descelularización parcial (54%). Un estudio piloto realizado en borregos, empleando esta matriz, no reveló reacciones adversas.

No hay pautas claras para el grado de descelularización necesario, porque los restos celulares en el tejido descelularizado no siempre impiden la regeneración de tejidos, es decir, no siempre la respuesta inmune es catabólica⁸⁸, el cartílago al ser un tejido avascular resulta inmunoprivilegiado en gran medida, lo que abre muchas más fuentes para la selección de la matriz extracelular sin problemas de rechazo⁸⁹, sin embargo, resulta importante seguir probando diferentes métodos de descelularización hasta encontrar aquel que disminuya, en mayor medida, el porcentaje de restos celulares, sin comprometer de manera significativa la MEC para futuros ensayos *in vivo*. Es conveniente realizar tinciones histológicas a la MCB después del tratamiento de descelularización, con el fin de analizar el efecto del procedimiento sobre las proteínas de la MEC.

9.2 Inmunofenotipo de las CMMs derivadas de tejido adiposo

La Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) ha establecido criterios mínimos para la identificación de CMMs humanas, entre estos se encuentran: poseer morfología fusiforme, poder ser aisladas por métodos enzimáticos y poseer la capacidad de adherirse a las cajas de cultivo, además de tener un marcaje positivo para CD90 (Thy-1), CD29 (VLA- β), CD44 (HCAM) y CD105 (endoglina); y ser negativas para al menos uno de los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45,^{90,91,92} algunos autores refieren a CD14^{92,93,49} también como negativo, sin embargo, estos criterios mínimos no son específicos de CMMs y describen propiedades compartidas por las células del tejido conjuntivo,¹⁹ además, la expresión de los marcadores varían dependiendo del tejido del que se aíslan y del tiempo en cultivo.

Los estudios desarrollados en ovejas no profundizan en el análisis de estos marcadores, lo que limita la disponibilidad de anticuerpos para esta especie. Los

marcadores CD44, CD90, CD45 y CD34 utilizados en el presente trabajo, cruzan con antígenos de humano, sin embargo, su reactividad en otras especies no había sido probada. Al utilizarlos para analizar las CMMs de borrego el resultado fue negativo para estos cuatro marcadores, a pesar de esto, se cumple con lo demás criterios mínimos propuestos por la ISCT. En general los resultados del análisis de estos marcadores sugieren un aislamiento exitoso de CMMs con características óptimas para su aplicación en terapias celulares.

9.3 Desarrollo de implantes

Estudios previos han investigado la habilidad del hidrogel de alginato como un andamio para la regeneración del cartilago,^{69,94} demostrando compatibilidad con los condrocitos,⁹⁵ como lo muestra el grupo de trabajo de Madry y col., donde sobreexpresando IGF-1⁹⁶ y FGF-2⁹⁷ de manera individual en condrocitos embebidos en alginato implantados en conejos durante 14 semanas, se observan por histología e inmunohistoquímica un aumento en la expresión de colágeno tipo II y una mejor morfología celular así como una mejora en la arquitectura del tejido nuevo a comparación del control.

El uso del alginato facilitó la manipulación y moldeamiento del implante generado, ya que en un inicio las células no eran retenidas de manera eficiente por la MCB. Una ventaja del alginato radica en poder controlar la porosidad del mismo dependiendo de la concentración utilizada (5-200 nm de diámetro)⁹⁸, Wang y col.⁹⁹, proponen la encapsulación de las células en 1% de alginato ya que este porcentaje proporciona las condiciones óptimas para la proliferación celular y el crecimiento de los agregados según su estudio, además discuten que concentraciones bajas de alginato (0.5%) no brindan resistencia mecánica para un cultivo prolongado y concentraciones altas (2%) inhiben la proliferación. Con el presente trabajo se demuestra que el uso de MCB y alginato 1.5% brinda las condiciones óptimas para la proliferación celular, sugiriendo que para obtener una mejor retención de las células en el andamio es favorable una prediferenciación celular con inductores condrogénicos y cultivar hasta alcanzar del 80 a 90% de confluencia por 7 días antes del ensamblaje del implante, además, como se observó en el ensayo de viabilidad celular, este pretratamiento potencia la proliferación debido a que la interacción células-célula y célula-matriz es más estrecha, esto es importante en etapas tempranas de la diferenciación condrogénica para la producción

de los componentes de la MEC^{12,22}.

En cuanto a la viabilidad celular Jinping y col.¹⁰⁰, reportan una pérdida de hasta el 20% en la viabilidad celular en una esfera de alginato 2% durante 24 días, al igual Madryl y col.⁹⁶, con una pérdida del 20% en la viabilidad después del tratamiento gelificante analizado por 36 días. Estos datos ponen de manifiesto que la técnica de encapsulación no es agresiva para las células, por lo que nuestros niveles de hasta 50% en la pérdida de viabilidad a los primeros 3 días del implante sugieren que esto se debe a remanentes químicos en la matriz debido al proceso de su descelularización con detergentes, por lo tanto sería conveniente realizar más lavados de mayor duración después del tratamiento.

Con el ensayo de ELISA se demostró la sobre-expresión al día 14 de la proteína IGF-1 mediada por adenovirus, la caída a niveles basales en el grupo I3C inferimos que se debe posiblemente a la pérdida del 50% en la viabilidad celular en los primeros 3 días en el implante, lo cual es inherente a la técnica empleada para manipular las células, o a los residuos químicos en la matriz post-descelularización, aunado a esto, el hecho de que la expresión del gen es transitoria debido a las características del vector, por lo tanto la proteína tiende a diluirse conforme se dividen las células transducidas.

9.4 Microestructura de implantes

Las células embebidas en el andamio mostraron una morfología redondeada, típica de un cultivo tridimensional, como lo reporta Awad y col. en distintos hidrogeles⁶⁹ y Xu y col. en un andamio de alginato,¹⁰⁰ sin embargo esta morfología puede perderse a lo largo del cultivo dependiendo de las condiciones y biomateriales utilizados, Zhensheng y col., reportaron que células en matrices de quitosan presentaron morfología fibroblastoide al día 21 al observarlas en MEB, así mismo Awad y col.⁶⁹, reportaron morfología poligonal en células cultivadas por 28 días en un andamio de gelatina, esto es indicativo de células desdiferenciadas e indeseable en el implante. Contrario a esto, las ultramicroscopías obtenidas por MEB de los implantes generados en este estudio, mostraron que aún al día 21 en el implante se conserva un fenotipo celular ovoide, característico de condrocitos, por lo tanto, el sistema de andamiaje sustenta el crecimiento celular adecuado.

9.5 Expresión de marcadores condrogénicos

Los análisis de expresión génica no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados, solamente para COL II, siendo mayor en el grupo de la CE en comparación al I3C. Este resultado no concuerda con el análisis densitométrico por Western blot de la misma proteína, lo que sugiere que a pesar de la expresión del mensajero no se manifiesta en la síntesis proteica. Pareciera que la inmunohistoquímica para COL II concuerda con los resultados en el análisis de expresión génica, ya que en el grupo de la CE se observa una tinción mayor que en el I3C; sin embargo, esta tinción aparece a nivel de citoplasma para el grupo de la CE y no en la MEC neoformada, indicando que el anticuerpo empleado identifica a la molécula precursora del colágeno llamada procolágeno, el cual es sintetizado en el retículo endoplásmico¹⁰¹; por lo tanto, no solo es importante la expresión de la proteína, sino la integración a la MEC, como se observó en el I2C e I3C.

Los análisis de expresión génica, muestran una misma tendencia de expresión para cada marcador entre los grupos experimentales, siendo mayor la expresión en el grupo de la CE, seguido del I2C y finalmente I3C, a excepción del marcador biglicano, aunque sin diferencias significativas. A pesar de observar, en las tinciones histológicas, una mayor síntesis de MEC para el I3C, probablemente esto no se ve reflejado en el análisis de expresión por dos posibles razones: 1. Debido a que los componentes de la MEC poseen poco recambio, probablemente no sea necesaria la expresión continua del RNAm para conservarlos una vez sintetizados *in vitro*; como el I3C contenía estos elementos ya integrados a su matriz neoformada al tiempo en que se llevó a cabo el análisis de expresión, esto podría explicar la baja expresión de los marcadores en este grupo. Posiblemente, a tiempos más tempranos, la expresión de estos marcadores fueron mayores, ya que el impacto de IGF-1 se da en etapas tempranas de la diferenciación condrogénica²²; 2. La segunda opción sugiere un efecto inhibitorio de la retrotranscriptasa y de la FastStart Taq DNA Polimerasa debido a la presencia de sales en las muestras. Los análisis de expresión génica al tiempo 0 y 14 de cultivo no pudieron realizarse debido a la presencia de sales que se ven reflejadas en la relación 260/230 en la cuantificación del RNA. Las relaciones óptimas 260/230 se consideran en un rango de 1.8 a 2, sin embargo, las muestras obtenidas en los tiempos 0 y 14 eran de 0.2 a 1.07, por lo que no pudieron emplearse para el análisis de qRT-PCR. Dichas sales se derivan del protocolo de extracción de RNA; debido a las

características del alginato la literatura sugiere el uso de cationes divalentes no gelificantes, como el citrato de sodio, para romper la estructura del alginato y así liberar las células para obtener un mayor rendimiento en la cuantificación del RNA. A pesar de que la relación 260/230 del tiempo 28 era de 1.08 a 1.78, los remanentes de estas sales pudieron afectar de igual forma la reacción enzimática, alterando los Cq's en los grupos experimentales sin presentar diferencias estadísticas debido a la variabilidad inherente a la técnica empleada. Se probaron métodos para desalar por columna y extracción por el método de CTAB, pero el rendimiento era bajo y no se lograban amplificar todos los triplicados en algunos casos. Por esta razón es necesario repetir este análisis con otra técnica de extracción de RNA.

9.6 Evaluación histológica del implante

El factor IGF-1, actúa de manera anabólica incrementando la producción de PGs y COL II.¹² En nuestro estudio, IGF-1 mostró un efecto importante en la producción de PGs como se observó con la tinción de safranina O/verde rápido, dando un color rojo intenso y una matriz más densa en comparación al I2C que carecía del adenovirus, por otra parte, con las pruebas inmunohistoquímicas se observó una producción moderada de COL tipo II. El aumento en la densidad de la MEC observado en las histologías para el grupo I3C parece relacionarse con el aumento significativo en el tamaño de los implantes al finalizar del cultivo, al parecer, esto es producto de la síntesis de PGs debido a que IGF-1 activa la vía de señalización PI3K dando lugar a la síntesis de los componentes de la MEC.^{56,102}

A pesar de la tinción leve por tricrómico de Masson para las fibras colágenas en la matriz neoformada en el I2C e I3C, un estudio piloto con este implante, mostró la síntesis de colágenas tres meses después de su implantación en un modelo ovino, Orth y col. muestran también que en conejos a los cuales se les implantaron condrocitos embebidos en alginato por tres semanas producen estas fibras⁹⁴.

El mapa de calor resalta de manera significativa dos parámetros en los que difieren el I2C e I3C, estos son “distancia entre las células y cantidad de matriz” y la tinción para COL I, siendo los resultados más favorables para el I3C. El resultado en el primer parámetro se debe a que los condrocitos son capaces de despolimerizar la MEC y eliminarla para ensanchar sus lagunas, pudiendo estar presentes de manera aislada o agrupados en grupos isógenos, dependiendo de su actividad metabólica; es decir, las

células que acaban de dividirse son condrocitos activos que poseen un aparato de Golgi muy grande y un citoplasma basófilo. Estas características indican que se está realizando una síntesis proteica y se ubican inicialmente en la misma laguna, pero a medida que secretan nueva matriz intercelular se van separando como se observa en el I3C. A diferencia de los condrocitos metabólicamente muy activos, los de baja o nula actividad poseen un citoplasma claro y un aparato de Golgi pequeño.^{7,11}

Un estudio similar a este trabajo es el desarrollado por Diekman y col.,⁷⁵ en el cual se utiliza una MCB y alginato (por separado), más inductores químicos y CMMs derivadas de tejido adiposo, los resultados inmunohistoquímicos muestran que ambos sistemas inducen un fenotipo condrocítico, observándose grandes cantidades de COL II, pero también de COL I, aunque en ausencia de COL X. Una diferencia a notar entre el trabajo de Diekman y col., y el desarrollado, es el uso de dexametasona, la cual no pudimos utilizar por no estar disponible. Se ha relacionado a la dexametasona con el aumento de COL II aunado a TGF- β ,¹⁰³ lo que pudiera explicar la tinción moderada que se obtuvo para COL II.

Otra investigación similar a este trabajo es la desarrollada por Chang y Col.,⁷⁴ ellos utilizaron fragmentos derivados del cartílago más COL I y CMMs sinoviales, lo cual cultivaron por 28 días con medio condrogénico que contenía (a diferencia de nuestro trabajo) dexametasona, TGF- β 3 y BMP-2. En sus ensayos de expresión génica observaron un aumento significativo de COL II en el día 28, sin embargo, visualmente la densidad de la matriz neoformada en sus implantes es moderadamente menor que la obtenida en nuestro trabajo por el grupo I3C. Resultaría interesante observar las características de nuestros implantes agregando dexametasona al medio de cultivo.

Los estudios histológicos evaluados por distintas tinciones específicas y calificados por la escala de Bern/O'Driscoll, muestran que el grupo de I3C genera un tipo histológico de cartílago más cercano al deseable para la regeneración (en un implante madurado por 28 días), lo que sugiere que es más adecuado para ensayos *in vivo*.

CAPÍTULO X CONCLUSIONES

Las CMMs aisladas mostraron el inmunofenotipo adecuado (CD105+, CD29+, CD45-, CD34-, CD14-).

Se definió un proceso fisicoquímico que minimiza la presencia de condrocitos xenogénicos para futuros usos preclínicos y clínicos.

Se generó un sistema de andamiaje de tres componentes (MCB/alginato, CMMs y Ad-IGF1), el cual provee un entorno temporal que ayuda a la infiltración, adhesión, proliferación y diferenciación de las células, con una distribución homogénea, produciendo una MEC densa con proteoglucanos propios del cartílago hialino y COL II. Por lo anterior se acepta la hipótesis propuesta.

Este trabajo es la base para posteriores estudios *in vivo* en el campo de la regeneración del cartílago articular.

CAPÍTULO XI PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos *in vivo* en modelo de *Ovis aries* con el I3C para tratar lesiones articulares.
- Evaluar la combinación IGF-1/FGF-2 con el mismo sistema de andamiaje generado *in vitro* e *in vivo*.
- Evaluar bioquímicamente los GAGs presentes en el implante.
- Evaluar proteínas de interacción célula-matriz y célula-célula por inmunofluorescencia.
- Evaluar bioquímicamente los GAGs presentes en el implante
- Evaluar mucopolisacáridos presentes en el implante por tinción de azul de toluidina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Toegel, S. *et al.* Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action. *BMC Mol. Biol.* **8**, 13 (2007).
2. Kisiday, J. D., Jin, M., DiMicco, M. a, Kurz, B. & Grodzinsky, A. J. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J. Biomech.* **37**, 595–604 (2004).
3. Farr, J., Cole, B., Dhawan, A., Kercher, J. & Sherman, S. Clinical cartilage restoration: evolution and overview. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **469**, 2696–705 (2011).
4. Álvarez-lozano, E., Lara-arias, J., Mendoza-lemus, Ó. & Martínez-rodríguez, H. Ingeniería tisular en la reparación de las lesiones articulares. *Ortho-tips* **5**, 308–314 (2009).
5. German, D., Falke, F. & Atala, A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch.argent.pediatr* **98**, 103–115 (2000).
6. Longo, U. G. *et al.* Stem cells and gene therapy for cartilage repair. *Stem Cells Int.* **2012**, 1–9 (2012).
7. Matsiko, A., Levingstone, T. & O'Brien, F. Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials (Basel)*. **6**, 637–668 (2013).
8. Jadin, K. D. *et al.* Depth-varying density and organization of chondrocytes in immature and mature bovine articular cartilage assessed by 3d imaging and analysis. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 1109–19 (2005).
9. Knight, M., Wang, C., Pacifici, M. & Fernandez, P. Development of articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, S2–S3 (2013).
10. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* **4**, 30–35 (2002).
11. Sopena, J., Carrillo, J. & Rubio, M. Estructura y función del cartílago articular. *En Portada/ Armas frente a la Patol. Articul.* 24–26
12. Chung, C. & Burdick, J. a. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 243–62 (2008).
13. Bastiaansen-jenniskens, Y. M. *A Novel Approach to Stimulate Cartilage Repair : Targeting Collagen Turnover.* 182 (2009).
14. Brodtkin, K. R., García, a J. & Levenston, M. E. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* **25**, 5929–38 (2004).

15. Dürr, J., Goodman, S. & Potocnik, A. Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp Cell Res.* **207**, 235–44 (1993).
16. Enomoto, M., Leboy, P., Menko, A. & Boettiger, D. Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res.* **205**, 276–85 (1993).
17. Ortíz, M. *Tejido óseo y cartílago*. 128–155
18. Temeno, J. S. & Mikos, A. G. Review : tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* **21**, 431–440 (2000).
19. Demoor, M. *et al.* Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2414–40 (2014).
20. Burdan, F., Szumiło, J., Korobowicz, A., Farooquee, R. & Patel, S. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol.* **47**, (2009).
21. Chimal, J. & Díaz, L. Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int J Dev Biol.* **43**, 59.67 (199AD).
22. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* **97**, 33–44 (2006).
23. Gaissmaier, C., Koh, J. L. & Weise, K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury* **39**, S88–96 (2008).
24. Chen, Y. *et al.* Insulin-like growth factor-1 boosts the developing process of condylar hyperplasia by stimulating chondrocytes proliferation. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 279–87 (2012).
25. Shanmugarajan, T., Kim, B., Lee, H. & Im, G. Growth Factors and Signaling Pathways in the Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Regen. Med.* **8**, 292–299 (2011).
26. Kenneth, F., Yoon, C., George, B., Andrew, L. & Anie, P. No TGF-b signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front. Biosci.* **S4**, 251–368 (2012).
27. Fortier, L. a, Barker, J. U., Strauss, E. J., McCarrel, T. M. & Cole, B. J. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **469**, 2706–15 (2011).
28. Shi, S., Mercer, S., Eckert, G. J. & Trippel, S. B. Growth factor transgenes interactively regulate articular chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* **114**, 908–19 (2013).
29. Aurich, M., Anders, J., Trommer, T., Liesaus, E. & Seifert, M. Histological and cell biological characterization of dissected cartilage fragments in human

- osteocondritis dissecans of the femoral condyle. *Arch Orthop Trauma Surg* **126**, 606–14 (2006).
30. Zapata, N., Zuluaga, N., Betancur, S. & López, L. CULTIVO DE TEJIDO CARTILAGINOSO ARTICULAR : acercamiento conceptual. *Rev. EIA* 117–129 (2007).
 31. Akiyama, H., Chaboissier, M., Martin, J. & A, S. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes dev.* **16**, 2813–2828 (2002).
 32. Beris, A. E., Lykissas, M. G., Papageorgiou, C. D. & Georgoulis, A. D. Advances in articular cartilage repair. *Injury* **36**, S14–23 (2005).
 33. Redman, S. N., Oldfield, S. F. & Archer, C. W. CURRENT STRATEGIES FOR ARTICULAR CARTILAGE REPAIR. *Eur. Cells Mater.* **44**, 23–32 (2005).
 34. Knecht, S. Biomechanical Assessment of Native and Tissue Engineered Articular Cartilage. 107 (2006).
 35. Schulze-Tanzil, G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Ann. Anat.* **191**, 325–38 (2009).
 36. Revell, C. M., Ph, D. & Athanasiou, K. A. Success Rates and Immunologic Responses of Autogenic , Allogenic , and Xenogenic Treatments to Repair Articular Cartilage Defects. *Tissue Eng. Part B* **15**, 1–15 (2009).
 37. Haleem, A. M. & Chu, C. R. Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair. *Oper. Tech. Orthop.* **20**, 76–89 (2010).
 38. Lutianov, M., Naire, S., Roberts, S. & Kuiper, J.-H. A mathematical model of cartilage regeneration after cell therapy. *J. Theor. Biol.* **289**, 136–50 (2011).
 39. Yan, H. & Yu, C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* **23**, 178–87 (2007).
 40. French, M., Rose, S., Canseco, J. & Athanasiou, K. Chondrogenic Differentiation of Adult Dermal Fibroblasts. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 50–56 (2004).
 41. Yates, K. E., Forbes, R. L. & Glowacki, J. New Chondrocyte Genes Discovered by Representational Difference Analysis of Chondroinduced Human Fibroblasts. *Cell tissues organs* **176**, 41–53 (2004).
 42. Nicoll, S., Smith, N. & Bhatnagar, R. Modulation of proteoglycan and collagen profiles in human dermal fibroblasts by high density micromass culture and treatment with lactic acid suggests change to a chondrogenic phenotype. *Connect tissue res* **42**, 59–69 (2001).
 43. Perez, M. & Lorenti, A. CELULAS TRONCALES (STEM CELLS) Y REGENERACION CARDIACA. *Medicina (B. Aires).* **66**, 574–582 (2006).

44. Caplan, A. I. & Ph, D. Mesenchymal Stem Cells : Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. *Tissue Eng.* **11**, 1198–1211 (2005).
45. Docheva, D., Haasters, F. & Schieker, M. Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors. *Curr. Rheumatol. Rev.* **4**, 155–160 (2008).
46. Erickson, G. R. *et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 763–9 (2002).
47. Gronthos, S. *et al.* Surface Protein Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *J. Cell. Physiol.* **189**, 54–63 (2001).
48. Freyria, A.-M. & Mallein-Gerin, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* **43**, 259–65 (2012).
49. Tögel, F. & Westenfelder, C. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev. Dyn.* **236**, 3321–31 (2007).
50. Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M. & Roberts, S. J. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J. Anat.* **213**, 66–72 (2008).
51. Kock, L., van Donkelaar, C. C. & Ito, K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* **347**, 613–27 (2012).
52. De Mattei, M. *et al.* Effects of physical stimulation with electromagnetic field and insulin growth factor-I treatment on proteoglycan synthesis of bovine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 793–800 (2004).
53. Khan, I. M. *et al.* In vitro growth factor-induced bio engineering of mature articular cartilage. *Biomaterials* **34**, 1478–87 (2013).
54. Lee, S.-H. & Shin, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 339–59 (2007).
55. Longobardi, L. *et al.* Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J. bone Miner. Res.* **21**, 626–36 (2006).
56. Taipaleenmäki, H. Factors regulating chondrogenic differentiation. 1–94 (2010).
57. Murphy, S. V, Skardal, A. & Atala, A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101**, 272–84 (2013).
58. Tabata, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface* **6**, S311–24 (2009).
59. Choi, J. H. *et al.* Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **16**, 413–26 (2010).

60. Tavassoli, A., Mahdavi-shahri, N. & Matin, M. M. Bovine articular cartilage decellularized matrix as a scaffold for use in cartilage tissue engineering. *Iran. J. Vet. Sci. Technol.* **4**, 1–8 (2012).
61. Scanlon, C. Cartilage Tissue Engineering Using a Modified Decellularized Porcine Cartilage Scaffold and a Novel Centrifugation Cell Seeding Technique. 53 (2012).
62. Glowacki, J. & Mizuno, S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* **89**, 338–44 (2008).
63. Ehrick, J. D. *et al.* Genetically engineered protein in hydrogels tailors stimuli-responsive characteristics. *Nat. Mater.* **4**, 298–302 (2005).
64. Hori, Y., Winans, A. & Irvine, D. Modular Injectable Matrices Based on Alginate Solution/ Microsphere Mixtures That Gel in situ and Co-Deliver Immunomodulatory Factors. *Acta Biomater* **5**, 969–982 (2011).
65. Häuselmann, H. J. *et al.* Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell Sci.* **107**, 17–27 (1994).
66. Park, H. & Lee, K. Y. Facile control of RGD-alginate/hyaluronate hydrogel formation for cartilage regeneration. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1107–1112 (2011).
67. Bhat, A., Hoch, A. I., Decaris, M. L. & Leach, J. K. Alginate hydrogels containing cell-interactive beads for bone formation. *FASEB J.* **27**, 4844–52 (2013).
68. Chomchalao, P., Pongcharoen, S., Sutheerawattananonda, M. & Tiyafoonchai, W. Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture. *Biomed. Eng. (NY)*. **12**, (2013).
69. Awad, H. a, Wickham, M. Q., Leddy, H. a, Gimble, J. M. & Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* **25**, 3211–22 (2004).
70. Mulder, L. *Cell Adhesion on Alginate Scaffolds for the Tissue Engineering of an Aortic Valve – A Review*. 45 (2002).
71. Liang, W.-H., Kienitz, B., Penick, K. & Welter, J. Concentrated Collagen-Chondroitin Sulfate Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res.* **94**, 1050–1060 (2011).
72. Shepherd, J. H. *et al.* Effect of fiber crosslinking on collagen-fiber reinforced collagen-chondroitin-6-sulfate materials for regenerating load-bearing soft tissues. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101**, 176–84 (2013).
73. Elder, B. D., Eleswarapu, S. V & Athanasiou, K. a. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* **30**, 3749–56 (2009).

74. Chang, C.-H. *et al.* Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **102**, 2248–57 (2014).
75. Diekman, B., Rowland, C., Lennon, D. & Caplan, A. I. Chondrogenesis of Adult Stem Cells from Adipose Tissue and Bone Marrow : Induction by Growth Factors and Cartilage-Derived Matrix. *Tissue Eng. Part A* **16**, 27–31 (2010).
76. Tan, H., Gong, Y., Lao, L., Mao, Z. & Gao, C. Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 1961–8 (2007).
77. Oh, S. H., Kim, T. H., Im, G. Il & Lee, J. H. Investigation of Pore Size Effect on Chondrogenic Differentiation of Adipose Stem Cells Using a Pore Size Gradient Scaffold. **127**, 1948–1955 (2010).
78. O'Brien, F. J., Harley, B. a, Yannas, I. V & Gibson, L. J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* **26**, 433–41 (2005).
79. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–91 (2005).
80. Chen, F. H., Rousche, K. T. & Tuan, R. S. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 373–82 (2006).
81. Hickey, D., Frenkel, S. & Di Cesare, P. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop* **32**, 70–6 (2003).
82. Lefebvre, V., Behringer, R. & Crombrughe, B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, S60–75 (2001).
83. Oligino, T., Yao, Q., Ghivizzani, S. & Robbins, P. Vector systems for gene transfer to joints. *Clin Orthop Relat Res* **379**, S17–30 (2000).
84. Steinert, A. F., Nöth, U. & Tuan, R. S. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* **39**, S97–113 (2008).
85. Gilbert, T. W., Sellaro, T. L. & Badylak, S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **27**, 3675–83 (2006).
86. Yang, Q. *et al.* A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **29**, 2378–87 (2008).
87. Rieder, E., Kasimir, M., Silberhumer, G., Seebacher, G. & Wolner, E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and

- susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* **127**, 399–405 (2004).
88. Benders, K. E. M. *et al.* Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends Biotechnol.* **31**, 169–76 (2013).
 89. Guilak, F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pr. Res Clin Rheumatol* **25**, 815–823 (2011).
 90. García, D. *Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica.* 197–221
 91. Arévalo, J., Páez, D. & Rodríguez, V. Células madre mesenquimales : características biológicas y aplicaciones clínicas . *NOVA* **5**, 177–184 (2007).
 92. Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P. & Giannoudis, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering : Techniques for isolation, expansion and application. *Int. J. care Inj.* **38S4**, S23–S33 (2007).
 93. Kundrotas, G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta Medica Litu.* **19**, 75–79 (2012).
 94. Orth, P. *et al.* Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **19**, 2119–30 (2011).
 95. Fragonas, E. *et al.* Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* **21**, 795–801 (2000).
 96. Madry, H. *et al.* Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther.* **12**, 1171–9 (2005).
 97. Kaul, G. *et al.* Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J. Gene Med.* **8**, 100–11 (2006).
 98. Li, Z., Gunn, J., Chen, M.-H., Cooper, A. & Zhang, M. On-site alginate gelation for enhanced cell proliferation and uniform distribution in porous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **86**, 552–9 (2008).
 99. Wang, N., Adams, G., Buttery, L., Falcone, F. H. & Stolnik, S. Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. *J. Biotechnol.* **144**, 304–12 (2009).
 100. Xu, J. *et al.* Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels. *Tissue Eng. Part A* **14**, 667–80 (2008).

101. Canty, E. & Kadler, K. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **118**, 1341–53 (2005).
102. Fisher, J. *Tissue Engineering*. 72–81 (2007).
103. Enochson, L., Brittberg, M. & Lindahl, A. Optimization of a chondrogenic medium through the use of factorial design of experiments. *Biores. Open Access* **1**, 306–13 (2012).

ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medio para CMMs

Este medio se prepara con medio DMEM adicionado con 5% de L-glutamina. Se agrega SFB para que finalmente quede a una concentración del 10%. Se añade antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) 1%. Se almacena a 4°C.

Medio condrogénico

Tomando como base el medio DMEM Advanced se suplementa con los siguientes reactivos para tener una concentración final de: ácido linoleico 5.33µg/ml, albúmina 1.25mg/ml, L-ascórbico 50µg/ml, L-prolina 40µg/ml, SFB 10% y L-glutamina 5%. Finalmente se filtra y se almacena a 4°C.

Solución de alginato 1.5%

Se agrega 1.5% de alginato al medio para CMMs, se mezcla en un tubo falcon de 15 ml y se calienta en baño María a 50°C agitando con vortex cada cierto tiempo hasta que la mezcla esté homogénea. Se esteriliza en campana con luz ultravioleta por 1 o 2 h. No autoclavar ni filtrar. Almacenar a 4°C

Buffer de citratos

Preparar una solución stock 0.1 M de ácido cítrico anhidro y otra solución stock 0.1 M de citrato de sodio dihidratado. Tomar 9.5 ml de la primera y 41.5 ml de la segunda, aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar a pH 6 con 5N NaOH y 1 N HCl. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

Solución de Bouin

Agregar 75 ml de ácido pícrico en solución saturada, 25 ml de formaldehído al 37% y 5 ml de ácido acético glacial. Almacenar a temperatura ambiente.

Colagenasa 0.1%

Agregar .100 gr de colagenasa en PBS 1X estéril. Filtrar y almacenar a -20°C

Buffers para Western blot

- **TBS-T**
 - NaCl 150mM
 - Tris-HCl 100mM pH 8
 - Tween 20 0.5%
- **Buffer de corrida 10X pH 8.3**
 - Trizma base 60.6 g
 - Glicina 112.6 g
 - SDS 10 gAforar a con agua destilada a 1 L.
- **Buffer de transferencia**
 - Trizma base 3 g
 - SDS 1 g
 - Glicina 14.4 g
 - Metanol 200 mlAforar a 1 L con agua destilada

ANEXO 2

PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

Transducción

1. Calcular el volumen necesario para transducir las cantidad de células empleadas a 100 MOI del vector Ad-IGF1. Es importante descongelar el vial en hielo hasta el momento de ser usado ya que con cada descongelación baja el título viral.
2. Eliminar el medio de cultivo.
3. Realizar 2 lavados con PBS.
4. Agregar la mínima cantidad posible que cubra la caja de cultivo con medio DMEM sin suero y la cantidad necesaria de Ad-IGF1. Incubar a 37°C y 5% CO₂ por 3 h.
5. Posteriormente completar al volumen normal de trabajo con medio completo e incubar a las mismas condiciones.

Extracción de RNA con TRIzol para muestras con alto contenido de polisacáridos

Fase de homogenizado

1. Agregar 1 ml de TRIzol por implante. Mantener en frío.
2. Sonicar 3 veces (1 pulso, 30 s, 100%) manteniendo en frío. Reposar 5 min.
3. Centrifugar a 12000 xg por 10 min a 4°C
4. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo.

Fase de separación

1. Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml que se utilizó de TRIzol.
2. Agitar en vortex por 15 min.
3. Incubar de 2 a 3 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12000 xg por 15 min a 4°C
5. Remover la fase acuosa de la muestra inclinando el tubo (400-500 μ l aproximadamente) y trasferir a un tubo nuevo. En dado caso de arrastrar la fase color rosa se puede repetir desde el paso 1 de la fase de separación.

Precipitación

1. Agregar un volumen de isopropanol frío (aproximadamente 500 μ l) y 0.2 volúmenes de una solución de citrato de sodio 0.8M con NaCl 1.2M a temperatura ambiente. Puede omitirse este paso si el alginato no representa problema después de sonicar.
2. Mezclar por inversión y precipitar toda la noche a -80°C
3. Descongelar y centrifugar a 12000 g por 10 min a 4°C .

Fase de lavado

1. Remover sobrenadante por decantación
2. Agregar 1 ml de etanol 100% frío, mezclar suavemente por inversión y precipitar a -80°C por 30 min.
3. Centrifugar a 15000 x g por 10 min a 4°C .
4. Realizar un lavado con etanol al 70% en agua-DEPC.
5. Centrifugar 12000 x g por 5 min a 4°C .
6. Eliminar sobrenadante por decantación y secar a temperatura ambiente
7. Resuspender la pastilla en 30 μ L de agua-DEPC.
8. Almacenar a -80°C .

Inclusión en parafina

1. Colocar las muestras en solución de Bouin por 14 h. Posteriormente realizar lavados con agua hasta eliminar la mayor cantidad posible del color amarillo.
2. Colocar las muestras en cassetts de inclusión y deshidratar en acetona graduales 70%, 90%, 90%, 100%, 100%, 20 min en cada una.
3. Colocar en las siguientes soluciones acetona/xilol, xilol 100%, xilol 100% cada una por 20 min.
4. Colocar en dos soluciones de parafina líquida por 30 min en cada una a 60°C .
5. Colocar las muestras en bloques de inclusión y embeber las muestras con parafina, dejar enfriar el bloque para después desmontarlo del bloque y proceder a hacer los cortes en microtomo.
6. Para poder realizar las tinciones las laminillas con los cortes se colocan en un horno a 60°C por 15 min para desparafinar, posteriormente se colocan en xilol 5 min, etanol/xilol 5 min, etanol absoluto 2 min, alcohol de 96° por 2 min y

enjuagar lentamente en agua destilada. Proceder a realizar las tinciones correspondientes.

Hematoxilina & Eosina

1. Una vez desparafinado se coloca en solución de hematoxilina por 2 min. Realizar dos lavados con agua de la llave lentamente.
2. Inmersión rápida en alcohol ácido. Lavar dos veces con agua de la llave lentamente, posteriormente con agua destilada.
3. Realizar dos inmersiones rápidas en agua amoniacal y enjuague lento con agua de la llave y agua destilada.
4. Hacer 6 inmersiones rápidas en eosina.
5. Deshidratar en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno. Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.

Tinción tricrómico de Masson

1. Una vez desparafinado colocar en solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente o de 30 a 60 min a 65°C.
2. Lavas con agua de la llave hasta que pierda el color amarillo y enjuagar con agua destilada.
3. Teñir núcleos con hematoxilina férrica de Weigert por 10 min.
4. Lavar con agua de la llave por 5 min. Enjuagar con agua destilada hasta que deje de salir el color de la hematoxilina.
5. Teñir en solución de fucsina-escarlata por 5 s (el tiempo depende de la muestra). Lavar en agua destilada hasta dejar de teñirse.
6. Colocar solución de ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 min. Enjuague breve en agua destilada.
7. Teñir con azul de anilina por 15 s (el tiempo depende de la muestra). Lavar con agua destilada hasta que deje de teñirse.
8. Hacer una inmersión de 15 s en ácido acético acuso al 1%.
9. Deshidratar en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno. Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.

Safranina O/ Verde rápido

1. Teñir núcleos con hematoxilina férrica por 2 min.

2. Lavar con agua de la llave por 8 min.
3. Teñir con verde rápido 0.1% por 6 min.
4. Colocar en ácido acético acuoso al 1% por 10 s.
5. Teñir con Safranina O acuso al 0.1% por 3 min.
6. Deshidratar en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno.
Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.

Inmunohistoquímica con el kit mouse & rabbit specific HRP/DAB detection IHC, Abcam

1. Las muestras incluidas en parafina se desparafinan y se hidratar con agua destilada por 20 s. Posteriormente se reactivar la antigenicidad del tejido con buffer de citratos pH 6 a 80-90°C por 20 min.
2. Lavar con PBS-Tritón (3 gotas en 500 ml de PBS) dos veces por 5 min.
3. Añadir peróxido de hidrógeno (3% en agua) para bloquear a la peroxidasa endógena por 20 min.
4. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una.
5. Añadir bloqueador de proteínas por 40 min.
6. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una.
7. Añadir el anticuerpo primario a la concentración adecuada e incubar toda la noche (anti-COL I, II y IX).
8. Recuperar anticuerpo primario y lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una.
9. Añadir el anticuerpo secundario biotinilado e incubar por 20 min.
10. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
11. Añadir la estreptavidina conjugada con peroxidasa e incubar por 20 min.
12. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
13. Añadir diaminobenzidina (DAB 10%) e incubar de 5 a 10 min.
14. Lavar con PBS y agua destilada.
15. Contrateñir con hematoxilina de Gill por 2 min.
16. Lavar con agua de la llave por 20 s y posteriormente con agua destilada hasta que deje de teñirse.
17. Deshidratar con alcoholes 95%, alcohol absoluto, alcohol/xilol por 15 s.
18. Aclarar con 2 cambios de xilol, cada uno de 15 s y montar con resina.